UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Avaliação da proporção de células mononucleares e de MMP-2 e 9 na periodontite crônica em fumantes e não-fumantes

Luis Eduardo Rilling da Nova Cruz

Pelotas, 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Luis Eduardo Rilling da Nova Cruz

Avaliação da proporção de células mononucleares e de MMP-2 e 9 na periodontite crônica em fumantes e não-fumantes

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenç ão do título de Doutor em Odontologia (área d e concentração: Dentística).

Orientador: Professor Doutor João Batista César Neto

Co-Orientador: Professora Doutora Adriana Etges

Pelotas, 2010

Dados de Catalogação da Publicação

N935a Nova Cruz, Luis Eduardo Rilling da.

Avaliação da proporção de Células mononucleares e de MMP-2 e 9 na periodontite crônica em fumantes e não-fumantes / Luis Eduardo Rilling da Nova Cruz ; orientador João Batista César Neto , coorient. Adriana Etges – Pelotas: UFPEL, 2010.
61f.:9 fig.; 9tab.
Tese (Doutorado) Dentística.Faculdade de dontologia.Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Doença periodontal. 2.Periodontite. 3. MMP-2 4. MMP-9 I.César Neto, João Batista (orient.). II.Etges, Adriana (co-orient.) III. Título.

D2

Bibliotecária: Cláudia Denise Dias Zibetti CRB-10/ 932

Banca examinadora

Professor Doutor João Batista César Neto (orientador)
Professor Doutor Geraldo Augusto Chiapinotto
Professora Doutora Lenita Maria Aver de Araújo
Professor Doutor Fábio Renato Manzolli Leite
Professor Doutor Rodrigo Varella de Carvalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista César Neto por seus conhecimentos, sua capacidade como orientador e sua amizade.

A Prof.ª Dr.ª Adriana Etges, minha co-orientadora, por sua disponibilidade e e seus ensinamentos fundamentais para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Varella por sua paciência e grande auxílio na execução deste trabalho.

As acadêmicas, hoje colegas, Ana Helena e Fernanda Lucas pela grande ajuda na “captação” dos pacientes para a realização deste estudo.

As técnicas de Laboratório Ivana e Silvana e a técnica administrativa Hilda por sua grande ajuda, apoio e bom humor na execução da parte laboratorial deste estudo.

Aos meus colegas de disciplina, Prof. Josué Martos e Luiz Fernando Silveira por seu coleguismo, incentivo e principalmente pela sua amizade, indispensáveis neste momento de minha vida profissional.

Aos meus familiares, por seu incondicional incentivo, apoio, compreensão e dedicação sempre nos momentos certos.

Resumo

NOVA CRUZ, Luis Eduardo Rilling. **Avaliação imunoistoquímica da proporção de células mononucleares e da expressão de MMP-2 e 9 na periodontite crônica em fumantes e não-fumantes.** 2010. 63p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós - Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O estudo teve como objetivo a avaliação imunoistoquímica da proporção de células mononucleares e da expressão zimográfica da MMP-2 e 9 na periodontite crônica em fumantes e não-fumantes. Foram examinados 127 pacientes dos quais 31 preencheram os critérios de inclusão e foram inseridos no estudo, sendo 16 não-fumantes e 15 fumantes. Estes pacientes foram operados e 31 biópsias foram coletadas de área interproximal de dentes com bolsa periodontal >5mm e divididas longitudinalmente em duas partes, uma para análise histológica e outra para zimografia. As amostras foram processadas histologicamente e expostas aos anticorpos monoclonais para células B (anti-CD20), células T de memória (anti-CD45RO) e monócitos ou macrófagos (anti-CD68). De maneira geral, as amostras apresentaram padrão semelhante, com um tecido conjuntivo subjacente ao epitélio oral rico em células inflamatórias. A análise histométrica demonstrou que a quantidade total de células inflamatórias mononucleares marcadas não diferiu entre fumantes e não-fumantes ($p>0,05$). Ao avaliar cada tipo celular separadamente, também não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$). Ao dividir as amostras em regiões (terço coronal, médio e apical) e avaliar a presença de cada tipo celular em cada uma das regiões também não foram detectadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p>0,05$). A avaliação das zimografias sugere que a expressão de MMP-2 e 9 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos ($p>0,05$). Assim, dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que os sítios com periodontite crônica de fumantes e não-fumantes não diferem em relação à quantidade e localização de células inflamatórias mononucleares e na expressão de MMPs 2 e 9.

Palavras chave: Doença periodontal, Periodontite, Metaloproteinase 9 da matriz, Metaloproteinase 2 da matriz.

Abstract

NOVA CRUZ, Luis Eduardo Rilling. **Avaliação imunoistoquímica da proporção de células mononucleares e da expressão de MMP-2 e 9 na periodontite crônica em fumantes e não-fumantes.** 2010. 63p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós - Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The objective of the present study was the immunohistochemical evaluation of the proportion of mononuclear cells and the expression of MMP-2 and 9 on chronic periodontitis between smokers and non-smokers. From the 127 patients examined 31(16 non-smokers and 15 smokers) fulfill the inclusion criteria were included in the study. These patients underwent surgical procedures and 31 biopsies were collected and divided in two parts, one for histological preparation and the other for zymography. Each sample was histologically processed and exposed to monoclonal antibodies for B cells (anti-CD20), memory T cells (anti-CD45RO) and macrophages or monocytes (anti-CD68) detection. The samples showed a similar pattern, with connective tissue rich in inflammatory cells. The histometric analysis showed that the total amount of mononuclear inflammatory cells labeled did not differ significantly between smokers and non-smokers ($p > 0.05$). Evaluating each cell type separately, significant differences were not detected between groups ($p > 0.05$). When stratifying the samples into regions (coronal, middle and apical third) to evaluate the presence of individual cell types in each region significant differences between the groups were not detected ($p > 0.05$). The zymography of the samples suggested that the expression of MMP-2 and 9 showed no statistically significant differences between the two groups ($p > 0.05$). Thus, within the limits of this study, we can conclude that sites with chronic periodontitis in smokers and non-smokers did not differ in the amount of mononuclear inflammatory cells and in the expression of MMPs 2 and 9.

Keywords: Periodontal disease, Periodontitis, Matrix metalloproteinase-9, Matrix metaloproteinase-2.

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Representação da obtenção de material para as análises.	29
Figura 2	Ilustração da técnica operatória. A: imagem radiográfica da região selecionada para a coleta de tecido gengival (entre os pré-molares); B: exame periodontal da área revelando 7 mm de profundidade de sondagem; C: incisão delimitando a área de tecido gengival relacionada com a bolsa periodontal; D: Retalho de espessura total elevado expondo o cálculo subgengival sobre a superfície radicular; E: Aspecto da superfície dental após raspagem e alisamento radicular; F: Suturas reposicionado os tecidos afastados.	30
Figura 3	Fotomicrografia de amostra corada pela técnica imunoistoquímica. Ilustração esquemática realizada em uma das amostras do presente estudo, mostrando a divisão em terços para a apresentação dos resultados. (# representa a porção voltada para o elemento dental; * marca o tecido conjuntivo fibroso no qual as contagens de células foram realizadas e as setas indicam o epitélio de revestimento da mucosa bucal.)	33
Figura 4	Fotomicrografias do terço coronário (magnificação de 100x e 400x) de uma das amostras de não-fumante positivas para o anticorpo anti-CD20.	39
Figura 5	Fotomicrografias do terço coronário (magnificação de 100x e 400x) de uma das amostras de fumante positivas para o anticorpo anti-CD45RO.	40
Figura 6	Fotomicrografias do terço médio (magnificação de 100x e 400x) de uma das amostras de não-fumante positivas para o anticorpo anti-CD68.	40
Figura 7	Quadro ilustrativo mostrando (magnificação de 400X) diversos padrões de marcação imunoistoquímica obtidos no presente estudo.	41

Figura 8 Ilustração da expressão das MMPs na marcação no gel durante o ensaio de Zimografia dos espécimes relativos à pacientes fumantes. 43

Figura 9 Ilustração da expressão das MMPs na marcação no gel durante o ensaio de Zimografia dos espécimes relativos à pacientes não-fumantes. 43

Lista de Tabelas

Tabela 1	Anticorpos utilizados no estudo	32
Tabela 2	Valores médios e desvio padrão para os parâmetros clínicos nos sítios selecionados e dados demográficos em fumantes e não-fumantes.	36
Tabela 3	Médias e desvio padrão do número de células marcadas para cada um dos anticorpos anti-CD-20, anti-CD45RO e anti-CD-68, em cada grupo experimental, considerando todo o tecido conjuntivo das amostras.	37
Tabela 4	Médias e desvio padrão do número de células positivas para o anticorpo anti-CD-20 em cada terço do tecido coletado (cervical, médio e apical), para cada um dos grupos experimentais.	38
Tabela 5	Médias e desvio padrão do número de células positivas para o anticorpo anti-CD-45RO em cada terço do tecido coletado (cervical, médio e apical), para cada um dos grupos experimentais.	38
Tabela 6	Médias e desvio padrão do número de células positivas para o anticorpo anti-CD-68 em cada terço do tecido coletado (cervical, médio e apical), para cada um dos grupos experimentais.	39
Tabela 7	Comparação dos níveis de expressão de MMP-9 entre os grupos de não-fumantes e fumantes.	42
Tabela 8	Comparação dos níveis de expressão MMP-2 entre os grupos de não-fumantes e fumantes.	42
Tabela 9	Comparação da atividade gelatinolítica entre os grupos de não-fumantes e fumantes.	42

Lista de Abreviaturas e Siglas

- WHO – World Health Organization
- EUA – Estados Unidos da America
- IgG – Imunoglobulina G
- IgG2 – Imunoglobuina G dois
- LPS – Lipopolissacarídeo
- PgE2 – Prostaglandina E dois
- IL-6, 8 e10 – Interleucina seis, oito e dez
- IL-1β – Interleucina um beta
- TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
- MMP-2,-8,-9,-13,-14,-15,-16,-17,-20,-23,-24,-25 – Metaloproteinase da matriz dois, oito, nove, treze, catorze, quinze, dezesseis, dezessete, vinte, vinte e três, vinte e quatro, vinte e cinco
- IL-1α – Interleucina um alfa
- OPG – Osteoprotegerina
- INF-ɣ – Interferon gama
- IL-1ra – Interleucina um ra (antagonista do receptor de IL-1)
- RANKL – ligante do receptor ativador do NFkB
- mm – milimetro
- G- – Gram negativo
- G+ – Gram positivo
- PMNs – Polimorfonucleares
- CPITN – Índice comunitário periodontal de necessidade de tratamento
- O_2 - Superóxido molécula de oxigênio
- H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
- TGF-β – Fator de crescimento tumoral beta
- PCR – Polymerase Chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- MEC – Matriz extracelular
- Zn^{++} – Zinco
- RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
- EGF – Fator de crescimento epitelial
- Pró-MMP-2 – pró-metaloproteinase-2
- TIMP-2 – Inibidor tecidual de metaloproteinase dois
- TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases
- TIMP-1 – Inibidor tecidual de metaloproteinase um

- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio de imunoadsorção enzimática
- PS – Profundidade de sondagem
- IP – Índice de placa
- IG – Índice gengival
- RG – Retração gengival
- UFPel – Universidade Federal de Pelotas
- H&E – Hemotoxilina e eosina
- µm – Micrômetro
- °C – Grau Celsius
- TA – Temperatura ambiente
- pH – Potencial hidrogeniônico
- PA – Pró-análise
- Tris-HCl – Tris hidroximetil amino metano cloridrato
- M – Molar
- BSA – Albumina sérica bovina
- TRIS – Tris hidróximetil amino metano
- DAB – Diaminobenzina
- PBS – Phosphate buffer solution (Solução tampão de fosfato)
- DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
- SFB – soro fetal bovino
- mg – miligrama
- ml – mililitro
- min – minuto
- SDS – Sodium dodecyl sulphate (Dodecil sulfato de sódio)
- mM – milimolar
- $CaCl_2$ – Cloreto de Cálcio
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- NEM – N-etil-maleimida
- DP – Desvio Padrão
- % – Por cento, porcentagem.
- F – fumantes
- NF – Não-fumantes

Sumário

Resumo **05**

Abstract **06**

Lista de Figuras **07**

Lista de Tabelas **09**

Lista de Abreviaturas e Siglas **10**

Sumário **12**

1. Introdução **13**

2. Objetivos **16**

3. Revisão de Literatura **17**

3.1 Patogênese da Doença Periodontal **17**
3.2 Metaloproteinases da Matriz (MMPs) 2 e 9 ..... **22**
3.3 MMPs na Doença Periodontal **24**

4. Materiais e Métodos **26**

5. Resultados **36**

6. Discussão **44**

7. Conclusões **48**

8. Referências Bibliográficas **49**

Anexos **59**

1. INTRODUÇÃO

O efeito do tabagismo na saúde geral tem sido amplamente discutido na literatura médica. Sabe-se que o hábito de fumar está intimamente ligado a um maior risco de doenças cardíacas, vários tipos de câncer e doenças pulmonares (WHO, 2009). Estas correlações são ainda mais importantes se consideramos o grande número de fumantes existentes em todo o mundo, cerca de 1,3 bilhões (WHO, 2009). Embora o consumo de tabaco tenha diminuído nos países desenvolvidos, observa-se um grande aumento nos países em desenvolvimento como o Brasil. Além do dano direto ao fumante, a influência que a fumaça de cigarro tem sobre as pessoas que convivem com fumantes (fumantes passivos) também pode gerar efeitos nocivos. Nos EUA, o fumo passivo provoca cerca de 3000 mortes por câncer de pulmão por ano, enquanto as outras formas de poluição em ambiente externo causam cerca de 100 mortes de câncer de pulmão por ano (WHO, 2009).

Essas informações têm levado pesquisadores de outras áreas da saúde a investigar os efeitos do consumo de cigarros. Na odontologia diversos estudos têm avaliado o impacto do tabagismo sobre a doença periodontal uma vez que esta é altamente prevalente. Está estabelecido que o consumo de cigarros é o principal fator de risco para doença periodontal e que os fumantes apresentam maior severidade e incidência dessa patologia (TOMAR; ASMA, 2000; KERDVONGBUNDIT; WIKESJO, 2002). Piores resultados após tratamento periodontal mecânico (SCABBIA et al., 2001; TROMBELLI et al., 2003), após regeneração tecidual guiada (TONETTI et al., 1995;) e altos índices de periodontite refratária são observados em fumantes (MAGNUSSON et al., 1994; MAGNUSSON & WALKER, 1996).

As investigações sobre as vias pelas quais o consumo de cigarros influencia a doença periodontal têm se voltado para os dois pilares primordiais da patogênese periodontal, ou seja, o biofilme bacteriano e a resposta do hospedeiro. Estudos avaliando o acúmulo de biofilme dental mostraram que não existem diferenças entre fumantes e não-fumantes neste aspecto (BERGSTROM et al., 2000; LINDEN; MULLALLY, 1994; AXELSSON et al., 1998). Os resultados de avaliações qualitativas da composição do biofilme têm sido controversos. Alguns estudos relataram que os tipos de bactérias presentes no biofilme de fumantes e não-fumantes não variam significantemente (DARBY et al., 2000; PREBER et al., 1992; STOLTENBERG et al., 1993). Por outro lado, outros trabalhos têm observado uma maior colonização por patógenos periodontais no biofilme subgengival de fumantes (GOMES et al., 2006; VAN WINKELHOFF et al., 2001). Em relação à resposta do hospedeiro diversas evidências parecem seguir no mesmo sentido, mostrando um

impacto do consumo de cigarros neste nível. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo e embora tenha sido reportado um maior número de neutrófilos na circulação periférica dos fumantes, sua função está prejudicada (NOBLE & PENNY, 1975). Os neutrófilos de fumantes têm apresentado uma menor quimiotaxia (KRAAL et al., 1979), fagocitose (MACFARLANE et al., 1992) e aderência (MACFARLANE et al., 1992). A fumaça de cigarro e a nicotina inibiram a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por neutrófilos estimulados *in vitro* (PABST et al., 1995; RYDER et al., 1998). Além disso, a nicotina mostrou um efeito apoptótico nesta primeira linha de defesa o que pode ser importante para a patogênese da doença periodontal, uma vez que a morte prematura destas células pode facilitar a contaminação bacteriana (MARIGGIO et al., 2001). Em relação à produção de anticorpos observou-se que o tabagismo diminui as concentrações séricas de IgG (QUINN et al., 1998) e os níveis séricos de IgG2 para certos patógenos periodontais (HABER et al., 1994).

A combinação de nicotina com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano aumentou a secreção de PGE2 pelos monócitos do sangue periférico (PAYNE et al., 1996) sugerindo que a nicotina e o LPS bacteriano exercem um efeito sinérgico na produção de mediadores inflamatórios (PAYNE et al., 1996; WENDELL et al., 2001). A nicotina também aumentou a produção de IL-6 em culturas de fibroblastos (WENDELL et al., 2001) e osteoblastos (EL-GHORAB et al., 1997). Uma maior produção de IL-1β foi observada em células mononucleares de fumantes (RYDER et al., 2002) e quando estas células foram expostas à fumaça de cigarro elas aumentavam a produção de TNF-α (RYDER et al., 2002). Em outro estudo investigando a influência da fumaça de cigarro sobre células mononucleares observou-se um aumento na expressão de 20 genes previamente associados com a patogênese das doenças periodontais (RYDER et al., 2004). Histologicamente observou-se que a inalação da fumaça de cigarro potencializa a perda óssea na doença periodontal induzida por ligaduras em ratos. Ao avaliar o tecido gengival adjacente às regiões com doença os autores deste estudo observaram maiores níveis de MMP-2 nos animais que inalaram fumaça (CÉSAR-NETO et al., 2004). Dois estudos recentes avaliaram a expressão de alguns genes em biópsias gengivais de pacientes com saúde periodontal, não-fumantes com periodontite e fumantes com periodontite (CÉSAR-NETO et al., 2006; 2007). Observou-se que IL-1β, IL-8, IL-10, TNF-α, MMP-8 e OPG estavam mais baixas nos fumantes, quando comparados aos não-fumantes com níveis semelhantes de periodontite. Por outro lado, IL-6, INF-γ e IL-1ra estavam mais altos. Ao avaliar a proporção de algumas moléculas com seus respectivos antagonistas constatou-se uma maior razão de RANKL:OPG e IL-6:IL-10 nos sítios com periodontite de fumantes (comparados aos de não-fumantes). Já para a razão IL1β:IL-1ra o grupo de fumantes apresentou

resultados semelhantes ao grupo de pacientes com saúde periodontal. LAPPIN et al. (2007) avaliou as concentrações séricas de RANKL e OPG em fumantes e não-fumantes com níveis similares de doença periodontal. Seus resultados foram semelhantes aos de CÉSAR-NETO et al. (2007) mostrando menores valores de OPG e maior relação RANKL:OPG nos fumantes. Porém, alguns estudos contestam a tendência de que o fumo aumenta a expressão de genes relacionados à inflamação (MOROZUMI et al., 2004, OUYANG et al., 2000, PETROPOULOS et al., 2004). Embora as informações disponíveis sejam altamente relevantes e contribuam para o entendimento da patogênese periodontal em fumantes mais estudos são necessários para se estabelecer o real papel dos componentes da fumaça de cigarro e temperatura neste processo.

A maioria dos estudos de patogênese da doença periodontal em fumantes avalia fluido crevicular, cultura de células ou tecidos processados o que impede a observação das diversas áreas da lesão. Além disso, resultados podem ser mascarados, uma vez que segundo Lappin et al. (1999) as diversas partes do infiltrado inflamatório periodontal parecem ter características distintas e que a área mais significante para a perda de inserção é a porção apical da lesão. Avaliações imunoistoquímicas já observaram diferenças na proporção relativa de células B, células T e macrófagos ao comparar periodontite crônica e agressiva. Entretanto, a literatura carece de estudos avaliando o impacto de fatores de risco para a doença periodontal, como o fumo, na proporção de células mononucleares em pacientes com periodontite crônica. Assim, o presente projeto, tem como objetivo avaliar comparativamente a proporção de células mononucleares em sítios com periodontite crônica avançada (bolsas > 5 mm) em indivíduos fumantes e não-fumantes. Adicionalmente, será investigado se os resultados prévios obtidos em animal (CÉSAR-NETO et al., 2004), os quais mostraram uma maior expressão de MMP-2 na periodontite induzida por ligadura em ratos submetidos a inalação da fumaça de cigarro, ocorrem também em humanos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a proporção de células mononucleares em sítios com periodontite crônica avançada (bolsas >5 mm) entre indivíduos fumantes e não-fumantes, através da técnica de imunoistoquímica, bem como avaliar o efeito do tabaco sobre a expressão de MMP-2 e 9, com o auxílio da zimografia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Patogênese da Doença Periodontal

A era moderna da patogênese, prevenção e tratamento das doenças periodontais teve início nos anos 60 com estudos em animais e em humanos evidenciando o papel fundamental das bactérias no início da gengivite e periodontite. Sendo o estudo “gengivite experimental em humanos” de Löe et. al., um marco para a Periodontia (KOMMAN, 2008; LÖE et al., 1965).

Discussões científicas e pesquisas baseadas neste conceito – bactéria causando doenças periodontais – levaram a grandes avanços em conhecimento nos anos 70 e 80. Nesta época bactérias (microbiota) específicas foram consideradas causadoras das doenças periodontais isto é, bactérias G-, anaeróbias ou microaerófilas. Também foi reconhecido o importante papel dos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), contribuindo para a destruição tecidual em humanos, assim como os seus mecanismos de ação (SLOTS, 1979; PAGE e SCHROEDER, 1976; THEILEIDE et al., 1986; SEYMOR, 1987).

Também houve uma compreensão que alguns padrões clínicos da doença ou fenótipos tinham microbiota e resposta do hospedeiro características. Neste período foi descrito o início e progressão da periodontite histologicamente (PAGE e SCHRÖEDER, 1976 e 1981). Na maioria dos modelos de patogênese nos anos 80, bactérias específicas iniciavam o processo de doença acionando a resposta do hospedeiro, que era protetora e destrutiva. A real destruição do tecido conjuntivo e osso resulta primariamente da ativação de mecanismos teciduais como as metaloproteinases de matriz (MMPs), IL-1 e prostaglandinas (Pg). Assim é feita a distinção entre o papel do desafio microbiológico e os mecanismos imunoinflamatórios na patogênese da doença periodontal (KOMMAN, 2008).

Até meados dos anos 90 sedimentou-se o conceito de uma relação direta entre o desafio microbiológico e as respostas imunológicas, mas também foi observada uma variação considerável na resposta do hospedeiro e na expressão clínica da doença (KOMMAN, 2008). Estas diferenças foram pesquisadas e apesar de dados epidemiológicos sugerirem que a exposição a acúmulos de placa levava à periodontite, os dados de estudos longitudinais, em animais e em humanos eram surpreendentes. Os estudos de Löe et al. (1978, 1986) determinaram a presença de três grupos distintos na população em relação ao desenvolvimento da periodontite, um de indivíduos com rápida progressão de doença periodontal (8%), um segundo grupo com progressão moderada (81%) e um terceiro grupo que apresentava um padrão de higiene oral pobre com gengivite, mas que desenvolvia uma periodontite

mínima ou não apresentava a doença (11%). (KOMMAN, 2008; LÖE et al.,1978 e 1986).

Na doença periodontal embora o desafio microbiano seja o fator iniciador, um número de outros fatores parecem modificar a expressão da doença, mas não são por si causadores da doença. Assim veio o reconhecimento que o fenótipo clínico não é simplesmente desafio microbiano traduzido por uma resposta padrão do hospedeiro. Surgiram fortes dados mostrando que o fumo e o diabetes eram possíveis determinantes da severidade da doença (KOMMAN, 2008).

Segundo Komman (2008), o hospedeiro, na ausência de fatores de risco modificadores da doença, parece responder de maneira apropriada ao acúmulo de placa bacteriana tentando proteger contra a invasão bacteriana, mostrando-se capaz de limitar a destruição dos tecidos periodontais. Surgiu evidência de que fatores modificadores, como fumo, na presença de acúmulo bacteriano alteram a resposta inflamatória e o processo reparador. Na presença de fatores modificadores como fumo, uma resposta exuberante e/ou reparo falho parecem levar a uma periodontite mais destrutiva.

A maioria dos estudos contemporâneos sugere que o fumo aumenta o risco às doenças periodontais entre duas e seis vezes e a diferença no tamanho da associação pode ser encontrada entre fumantes e ex-fumantes (THOMSON et al., 2007; MOIMAZ et al., 2009). Tomar e Asma, 2000, realizaram um estudo com a finalidade de examinar a relação do consumo de cigarro e a periodontite e ainda estimar, na população adulta dos EUA, a proporção de periodontite atribuída ao hábito de fumar. Baseados nos achados do estudo concluíram que o hábito de fumar é um grande fator de risco para a periodontite e ainda que pode ser responsável por mais da metade dos casos de periodontite entre os adultos nos EUA. Também concluíram que grande proporção de periodontite em adulto poderia ser evitada através da prevenção e do cessar o hábito de fumar.

Thomson et al. 2007, realizaram um estudo retrospectivo, com o objetivo de descrever e quantificar a associação entre o consumo de tabaco em longo prazo e a periodontite em uma população aos 32 anos de idade. Também tinha como objetivo determinar os efeitos do ato de parar de fumar na condição periodontal nesta mesma população. Os autores concluíram através de seus resultados que aqueles que fumavam em todas as idades examinadas tinham cinco vezes mais chance de serem casos incidentes de periodontite entre as idades de 26 e 32 anos e que 2/3 destes casos estavam diretamente relacionados ao fumo. Este estudo (Thomson et al. 2007) também demonstrou os benefícios de parar de fumar no grupo avaliado entre as idades de 26 e 32 anos. A prevalência entre aqueles que haviam parado de fumar aos 26 anos era quase tão baixa quanto os que nunca haviam fumado.

Atualmente está bem estabelecido que o consumo do tabaco (fumo) está entre os mais importantes, senão o mais importante, fator de risco das doenças periodontais (RYDER, 2007).

Grossi et al. (1994), com o objetivo de avaliar indicadores de risco específicos associados com a suscetibilidade ou resistência a formas severas de doença periodontal, realizaram um estudo transversal que incluiu 1426 pacientes entre 25 e 76 anos de idade. Foram feitas associações entre a extensão da doença periodontal e as características do paciente que incluíam idade, hábito de fumar, doenças sistêmicas, exposição a riscos ocupacionais e microbiota subgengival. Os resultados deste estudo mostraram que a idade foi o fator mais fortemente associado com a perda de inserção. Que o diabete foi a única doença sistêmica positivamente associada com a perda de inserção. O fumo mostrou riscos conforme a quantidade de cigarros consumidos por ano. Também a presença de duas bactérias, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* representam risco à perda de inserção (GROSSI et al., 1994).

Estudo realizado por Axelsson et al. (1998) teve como objetivo observar a prevalência e severidade da doença periodontal e cárie dental em fumantes e não-fumantes em uma amostra randomizada (aleatória) de pacientes nas idades de 35, 50, 65 e 75 anos. Foram registradas as seguintes variáveis: número de dentes, nível de inserção, envolvimento de furca, “CPITN” (índice comunitário de necessidade de tratamento periodontal), prevalência de cárie e restaurações e índice de placa. Também foi realizado questionário sobre uso do cigarro (tabaco), hábitos de higiene oral e dieta. Em todos os parâmetros estudados os fumantes apresentaram números (índices) desfavoráveis à saúde dento/periodontal. Assim, baseado nestes dados, o estudo conclui que o fumo é um significativo fator (indicador) de risco para perda dentária, perda de inserção e cárie dentária.

Ryder (2007), em um estudo de revisão, relata que o fumo influencia a resposta do hospedeiro tanto na bolsa periodontal como no tecido periodontal. Neste estudo é enfatizado como o fumo pode desequilibrar negativamente a homeostasia aumentando as atividades destrutivas em relação às atividades reparativas. O autor também relata que na bolsa periodontal o fumo pode alterar a resposta inflamatória dos neutrófilos diminuindo sua capacidade de fagocitose, quimiotaxia e liberação de produtos oxidantes destrutivos como superóxido O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O fumo assim indica os estudos, parece estimular a migração de neutrófilos dos vasos para o tecido conjuntivo, mas uma vez no tecido com exposição contínua, o fumo dificulta a sua taxia para a bolsa periodontal e ainda que estes neutrófilos, no tecido, estariam expostos às substâncias do fumo que poderiam penetrar no tecido superficial e desencadear um processo destrutivo (FREDRIKSSON et al., 1999; RYDER et al., 1998). Somando-se a isto a presença

de enzimas destrutivas como as MMPs e elastáse no tecido e na bolsa periodontal tendo papel importante na destruição periodontal. Ainda segundo o autor, outro estágio de patogênese periodontal ocorre quando o biofilme supera as defesas na bolsa periodontal e produtos bacterianos penetram no tecido conjuntivo fibroso subjacente. Os neutrófilos ainda participam do processo destrutivo e de proteção (embora alteradas pelo fumo), mas o principal componente nesta segunda linha de defesa é a população de monócitos/macrófagos. Assim, no tecido o balanço entre destruição/proteção é amplamente mediado pelo tipo de padrão de citocinas secretadas por estas células. Pode-se ter um perfil mais destrutivo constituído de citocinas como IL-1ß, IL-1α, TNFα, PG, IL-6 e IL-8 ou um perfil mais protetor/reparador com citocinas como TGF-ß, interferon e fator de crescimento semelhante à insulina. A predominância de um perfil sobre o outro determinará se haverá destruição ou reparo periodontal. Estudos indicam que o fumo está associado a este perfil mais destrutivo.

O efeito do cigarro (tabaco) na composição da microflora é outra área crítica para os estudos. Alguns estudos relatam não haver diferenças significativas na microflora de fumantes e não-fumantes.Stoltenberg et al. (1993) investigaram a prevalência de 5 bactérias associadas à doença periodontal em fumantes e não-fumantes. Foram medidos os índices de placa, de cálculo, sangramento gengival e profundidade de sondagem em superfícies interproximais de dentes de um sextante escolhido aleatoriamente em 126 não-fumantes e 63 fumantes semelhantes em idade, sexo, índice de placa e cálculo. Amostras de placa subgengival destes mesmos sítios foram coletadas e pesquisadas quanto à presença de *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetencomitans, Prevotella intermedia, Eikenella corrodens e Fusobacterium nucleatum*. Estes dois grupos foram comparados quanto aos parâmetros clínicos e microbiológicos. O estudo não encontrou diferenças significantes na prevalência das bactérias estudadas nos dois grupos, apesar de achar diferença significante na associação da presença de *Actinobacillus actinomycetencomitans, Prevotella intermedia* e *Eikenella corrodens* e o fumo em bolsas >3,5mm.

Num estudo subseqüente, Darby et al. (2000) compararam a microflora em pacientes fumantes e não-fumantes com duas formas de doença periodontal, periodontite do adulto e periodontite de estabelecimento precoce generalizada. O estudo utilizou a técnica do PCR (reação em cadeia de polimerase) para determinar a presença de *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermídia*, *Bacteróides forsythus* e *Treponema denticola* em amostras de placa subgengival dos pacientes. O estudo não encontrou diferenças significantes na prevalência destes microorganismos entre o grupo de fumantes e não-fumantes,

apesar de encontrar diferenças estatísticas entre os grupos nas diferentes formas da doença periodontal.

Gomes et al. (2008), estudaram os efeitos do controle de placa supragengival sobre a placa subgengival em fumantes e não-fumantes. Exames clínicos e coleta de amostras de placa subgengival foram executados no início do estudo em 30, 90 e 180 dias. A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para detectar e quantificar *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra (Peptostreptococcus micros*), *Dialister pneumosintes*, *Aggregatibacter actinomycetencomitans* (*Actinobacillus actinomycetencomitans)*. Os resultados do estudo mostraram que houve uma redução significante na contagem geral de micro-organismos ao longo do tempo tanto em fumantes como em não fumantes não havendo diferenças estatísticas entre estes grupos.

Porém vários estudos relatam haver diferença entre fumantes e não fumantes em relação à composição da microflora.

Estudo desenvolvido por Schiloah et al. (2000) teve como objetivo determinar se o fumo aumentava a colonização de bactérias patogênicas em uma população sem periodontite. Foi pesquisada a presença das seguintes bactérias: *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermídia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Bacteróides forsythus* e *Treponema denticola*. Foi realizada a técnica com sonda de DNA em 25 pacientes de cada grupo. Os resultados, entre outros, mostraram nenhuma diferença estatística nos parâmetros clínicos entre os grupos (pacientes sem periodontite), que de oito pacientes infectados com pelo menos um periodontopatógeno estudado sete eram não-fumantes. O estudo conclui que a colonização do sulco gengival em pacientes com periodontite esta relacionada a quantidade e duração do hábito de fumar. Conclui também que os pacientes fumantes tinham 18 vezes mais probabilidade de serem infectados por bactérias periodontopatógenos do que os não-fumantes.

Van der Velden et al. (2003), em um estudo retrospectivo, investigou a influencia do cigarro (fumo) sobre o tratamento da periodontite e a composição da microflora subgengival. Dados clínicos e microbiológicos foram coletados antes e depois do tratamento periodontal. Foram analisadas as seguintes bactérias: *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia, Bacteróides forsythus, Fusobacterium nucleatum e Peptostreptococcus micros*. Uma melhora significante na condição clínica foi encontrada em ambos os grupos. Em relação à microbiota os resultados mostraram não haver diferença entre os grupos antes do tratamento. Após o tratamento o grupo de não-fumantes apresentou redução significante em todas as bactérias estudadas. Já o grupo dos fumantes apenas a *Porphyromonas gingivalis* teve redução significativa. Com estes

dados o estudo conclui que os não-fumantes tiveram uma redução maior na prevalência de bactérias periodontais comparado aos fumantes.

3.2 Metaloproteinases da Matriz (MMPs) 2 e 9

As células de um tecido normalmente estão em contato com uma rede complexa de macromoléculas extracelulares denominada de matriz extracelular (MEC). Esta matriz ajuda a manter células e tecidos unidos, mantendo uma estrutura organizada onde as células podem migrar e interagir entre si. Também ajuda a suportar a maior parte do estresse mecânico infligido àquele tecido. A matriz extracelular (MEC) pode ser conceituada como um espaço extracelular, preenchido por um complexo de componentes fibrosos e protéicos, com variadas proporções de proteínas e polissacarídeos que fornecem um substrato adequado para o crescimento e também para a diferenciação dos mais variados tipos celulares do organismo (PEREIRA et al. 2005, ALBERTS et al. 1997).

Segundo Haake et al., 2004, as metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas que degradam os componentes da matriz extracelular como o colágeno, a gelatina e a elastina. As MMPs dos vertebrados atuam em diversos substratos e parecem ser capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular (De SOUZA et al., 2005; STERNLICHT; WERB, 2001).

É difícil dizer com segurança quantas enzimas existem, pois a cada momento são descobertos novos membros da família das MMPs. Birkedal-Hansen (1993) afirma que a família dos genes MMP codifica pelo menos nove endopeptidases metal-dependentes. Todas as MMPs são derivadas de uma estrutura com cinco domínios que pela adição ou deleção de um ou mais domínios surgem as diferentes formas de MMP com suas particularidades. Todas as formas contêm um sítio de ligação para um íon Zn++ que se acredita seja o sítio ativo da enzima (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; De SOUZA et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; REYNOLDS; MEIKLE, 1997; RUNDHAUG, 2003; STERNLICHT; WERB, 2001).

Nabeshima et al., 2002 sugerem que as metaloproteinases sejam referidas de acordo com nomes específicos ou por uma numeração e também agrupadas de acordo com a sua estrutura. De Souza e Line (2002) e Pereira *et al*. (2005) listam algumas das MMPs humanas catalogadas, de acordo com o substrato em que atuam, como colagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinas (MMP-3, -10 e -11), metaloelastase (MMP-12), enamelisina (MMP-20) ,metaloproteinases ligadas à membrana plasmática (MMP-14, -15, -16, -24, -17, -25) e matrilisina (MMP-7 e -26).

Para exercerem sua função, nos processos fisiológicos ou patológicos, as MMPs precisam estar presentes no tipo celular e região pericelular no momento certo, na quantidade certa e precisam ser ativadas ou inibidas apropriadamente. Quanto à secreção, a maioria das MMPs são secretadas tão logo seja traduzido o seu RNAm, sendo então constitutivas do tecido, no entanto, a MMP-8 e a MMP-9 podem ser sintetizadas por granulócitos na medula óssea sendo armazenadas em grânulos dos neutrófilos circulantes e liberadas quando estes são ativados por mediadores inflamatórios (STERNLICHT e WERB 2001). Assim, segundo Birkedal-Hansen (1993), a colagenase dos leucócitos polimorfonucleares (PMNs) é liberada de grânulos específicos existentes nestas células quando estas são ativadas enquanto que as dos fibroblastos são transcritas de acordo com a demanda. O grupo das estromelisinas atua em diversos substratos como a proteína núcleo das proteoglicanas, colágeno tipos IV e V, fibronectina e laminina e é expressa por células estromais mediante estímulos por citocinas como o IL-1, o EGF e o TNF-α. As gelatinases são talvez as mais distribuídas das MMPs e podem ser produzidas por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, monócitos/macrófagos, osteoblastos e condrócitos. Algumas formas de gelatinases podem ser expressas por PMNs. Além da proteína gelatina, estas enzimas podem clivar elastina e colágeno dos tipos IV, V, VII e X.

A produção de MMP-2 ocorre na sua forma inativa (Pró-MMP-2) e para que ocorra a sua ativação é preciso a ação da MT1-MMP, e também a participação de uma molécula de TIMP-2 como ponte, formando um complexo trimolecular (KUBOTA et al., 2002; NABESHIMA et al., 2002; PATTAMAPUN et al. 2003). A MMP-2 é expressa por uma variedade de células normais ou tumorais e tem a capacidade de degradar gelatina, colágenos dos tipos IV, V e X na sua forma nativa, além de laminina, TGF-ß, e colágeno dos tipos I, II e III desnaturados (KUBOTA et al., 2002; STAMENKOVIC, 2000; WESTERMARCK e KÄHÄRI, 1999).

De Souza et al. (2005) descrevem A MMP-9, ou gelatinase B, como uma enzima expressa por PMNs, macrófagos, ceratinócitos e células endoteliais com atuação nos colágenos do tipo IV, V e IX, em proteoglicanas e na elastina. Sua expressão é controlada por fatores como o TNF-α, a IL-1, o PDGF e o EGF.

Assim como a MMP-2, a MMP-9 também é produzida na sua forma inativa, no entanto o seu mecanismo de ativação *in vivo* ainda não está completamente elucidado (KUBOTA et al., 2000; KUBOTA et al., 2002). Segundo Van Den Steen *et al*. (2002) ela é ativada principalmente por outras MMPs e tem sua atuação na biologia óssea de maneira a participar na regulação do *turn-over* ósseo, mas quando desregulada na sua síntese, secreção ou ativação resulta em reabsorção óssea patológica.

3.3 MMPs na Doença Periodontal

A destruição tecidual característica da periodontite, já foi considerada efeito direto das bactérias e seus produtos. Hoje é considerada efeito principalmente da resposta inflamatória do hospedeiro que é estimulada no local pelos produtos bacterianos. Os produtos liberados pelos periodontopatógenos são capazes de estimular respostas inflamatórias e imunológicas altamente ricas em mediadores como prostaglandinas, IL-1, TNF-α e outros. Estes mediadores por sua vez estão ligados à ativação das formas latentes de MMPs em formas ativas e também no estímulo a produção das MMPs (REYNOLDS e MEIKLE, 1997 e SORSA, TJÄDERHANE e SALO, 2004).

Altos níveis de MMPs nos tecidos periodontais são os responsáveis pelo desequilíbrio entre produção e degradação de colágeno causando destruição periodontal (De SOUZA e LINE, 2002). Fragmentos de gengiva inflamada apresentam mais colagenase que fragmentos de gengiva sadia. Colagenases detectadas no fluido do sulco gengival estão em quantidade maior em gengivas com doença periodontal, inclusive sendo correlacionados com severidade aumentada da doença. As MMPs mais comumente detectadas são a colagenase-2 ou MMP-8, acompanhada da MMP-9 (SORSA, TJÄDERHANE e SALO, 2004).

De acordo com Genco (1992) a degradação do tecido conjuntivo fibroso na doença periodontal ocorre devido à ação de enzimas bacterianas e enzimas do hospedeiro como a plasmina e as MMPs. Haake et al. (2004) afirmam que as MMPs são consideradas as proteinases primárias envolvidas na degradação dos tecidos periodontais.

Smith et al. (2004) estudaram a expressão da MMP-9 no epitélio gengival de indivíduos com doença periodontal para determinar a participação desta na degradação da membrana basal e inferir sua participação na migração do epitélio juncional para apical na formação da bolsa periodontal. Utilizando a zimografia em biópsias gengivais demonstrou que tanto o epitélio quanto o tecido conjuntivo de amostras de periodontite expressaram capacidade colagenolítica correspondente à expressão de MMP-2 e MMP-9. Foram encontrados altos níveis de pró-MMP-9 no epitélio da bolsa em comparação ao epitélio sulcular normal. A mesma diferença não pôde ser detectada para a pró-MMP-2. Foi observado que a MMP-9 distribuía-se por todas as camadas epiteliais (epitélio juncional e epitélio da bolsa) e fracamente expressa e distribuída no tecido conjuntivo gengival. Forte marcação para MMP-9 foi detectada em leucócitos polimorfonucleares. Os ceratinócitos do epitélio gengival foram identificados como fonte importante de MMP-9 no epitélio gengival inflamado.

Conforme Genco (1992) está claro que as bactérias do biofilme são capazes de ativar diretamente MMPs ou inibir a ação dos TIMPs, assim como indiretamente produzir citocinas através da estimulação de células do hospedeiro, que por sua vez, induzem outras células como fibroblastos e ceratinócitos a produzirem colagenases.

Segundo Grenier e Mayrand (2001) na inflamação periodontal causada por periodontopatógenos, as MMPs são produzidas de maneira descontrolada ocorrendo um desequilíbrio entre a atividade das MMPs e de seus inibidores teciduais (TIMPs) resultando em degradação tecidual. Os autores também realizaram um estudo com o objetivo de determinar se a *Porphyromonas gingivalis* possui a capacidade de degradar e/ou inativar a TIMP-1. A análise em eletroforese mostrou que a *Porphyromonas gingivalis* foi capaz de degradar a TIMP-1 em vários fragmentos. Também foi demonstrada inibição de MMP-9 quando adicionada no ensaio TIMP-1 tratada com bactérias previamente aquecidas para inativação das proteases. A mesma inibição da MMP-9 não foi observada quando a TIMP-1 adicionada havia sido tratada com bactérias proteoliticamente ativas, significando que inibição da TIMP-1 pelo *Porphyromonas gingivalis* tem efeito claro sobre a MMP-9 e, portanto, também sobre a degradação da matriz extracelular. Os autores concluem que a degradação periodontal pode ser favorecida pelo aumento significante de MMPs ativas, causada pela redução dos seus inibidores (TIMPs), nos sítios onde existe a presença de *Porphyromonas gingivalis*.

Em um estudo de Soell, Elkaim e Tenenbaum (2002) foram avaliadas biópsias gengivais e fluido do sulco gengival de 11 pacientes com periodontite e cinco pacientes saudáveis. Foram avaliados os níveis de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. As enzimas e os inibidores em questão foram quantificados e tiveram suas atividades mensuradas pelos testes de ELISA, Western-blot e zimografia. Todas as MMPs estudadas mostraram níveis maiores em pacientes com periodontite que nos pacientes controle, tanto nas biópsias quanto no fluido do sulco gengival. As TIMP-1 e TIMP-2 mostraram-se reduzidas nos pacientes com periodontite, além de demonstrar aumento nas atividades das MMPs nos casos de periodontite.

4. MATERIAIS E METODOS

Foi realizada uma análise transversal de pacientes fumantes e não-fumantes acometidos por periodontite crônica segundo os critérios da Academia Americana de Periodontologia (1999). Todos os voluntários foram submetidos à anamnese e exame periodontal que incluiu profundidade de sondagem (PS), índice de placa (IP), índice gengival (IG) e retração gengival (RG). Após estes procedimentos os seguintes critérios de inclusão e exclusão foram levados em consideração para a seleção da amostra.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

4.1.1. Critérios de Inclusão:

Foram incluídos no estudo 31 pacientes sendo 15 fumantes e 16 não-fumantes. De acordo com os critérios de inclusão estabelecidos participaram do estudo, voluntários dentados ou parcialmente edêntulos (com pelo menos 14 dentes naturais), que apresentavam o consumo de cigarros como único fator de modificação da resposta periodontal frente ao biofilme bacteriano (critério válido para o grupo de fumantes). Os voluntários foram selecionados de forma aleatória e apresentavam periodontite crônica, bolsas periodontais >5 mm e pelo menos um dente com necessidade de acesso cirúrgico para raspagem ou indicado para extração por motivo periodontal. Os fumantes consumiam ao menos 10 cigarros/dia por mais de cinco anos e os não-fumantes nunca tinham sido tabagistas.

4.1.2. Critérios de Exclusão:

Foram excluídos indivíduos que relataram na entrevista qualquer evidência de fatores modificadores sistêmicos da doença periodontal diferentes do tabagismo. Os fatores descritos na literatura incluem: osteoporose, alcoolismo, imunossupressão adquirida ou induzida, qualquer alteração hormonal descrita na literatura como potencial modificador do perfil da doença periodontal, estresse físico/emocional, medicamentos que influenciam os tecidos periodontais. Também foram excluídos da amostra mulheres grávidas ou lactantes, indivíduos que tinham

tomado antibióticos, antiinflamatórios ou terapia hormonal (anticoncepcional e terapia de reposição hormonal), e/ou que tinham recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses anteriores a cirurgia. Tais critérios foram utilizados para evitar a presença de fatores de confundimento que poderiam interferir nos resultados da pesquisa.

4.1.3. Critérios Clínicos de Inclusão:

Os voluntários deveriam ser dentados ou parcialmente edêntulos (com pelo menos 14 dentes naturais), apresentando o consumo de cigarros como único fator de modificação da resposta periodontal frente ao biofilme bacteriano (critério válido para o grupo de fumantes). Os voluntários foram selecionados nas clínicas da Faculdade de Odontologia da UFPel e tinham periodontite crônica com bolsas periodontais >5mm e pelo menos um dente com indicação para acesso cirúrgico para raspagem ou extração por motivo periodontal.

Após a anamnese e o exame clínico foram selecionados 31 voluntários que preencheram os critérios de inclusão, sendo 15 não-fumantes e 16 fumantes. Todos esses voluntários concordaram em participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) que foi revisado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFPel, sob o Parecer nº. 038/2008 (anexo 2) .

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O protocolo de pesquisa passou pela aprovação do comitê de ética em pesquisa. Todos os participantes foram esclarecidos sobre a finalidade da pesquisa e os procedimentos a que seriam submetidos. Estando de acordo em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Os voluntários tinham liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento se assim desejassem, sem prejuízo ao seu tratamento.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE COLETA DAS AMOSTRAS

Os voluntários selecionados para o estudo foram examinados clinicamente. O exame periodontal incluiu: profundidade de sondagem (PS), índice de placa visível (IPV), índice gengival (IG) e retração gengival (RG). Além disso, os voluntários da pesquisa receberam orientação em relação ao controle mecânico do biofilme dental bacteriano e remoção de cálculo supra gengival pelo menos duas semanas antes do procedimento cirúrgico.

Foi escolhida para a coleta do tecido uma das faces proximais do dente com necessidade de acesso cirúrgico para raspagem ou indicado para extração por motivo periodontal, a qual deveria apresentar uma bolsa periodontal maior que 5 mm. Durante a cirurgia, o “prisma” de tecido abaixo do ponto de contato foi delimitado pelas incisões intra-sulculares vestibular e lingual/palatina. Uma incisão na base desse prisma finalizou a remoção do tecido para a análise. Em caso de dentes isolados foram realizadas duas incisões paralelas (com cerca de 5 mm), partindo da face com bolsa periodontal, distantes cerca de 3 mm entre si e unidas em sua outra extremidade (figuras 1 e 2). O prisma de tecido gengival delimitado por essas incisões, pelo tecido ósseo subjacente e pela parede dental, foi removido e utilizado no estudo.

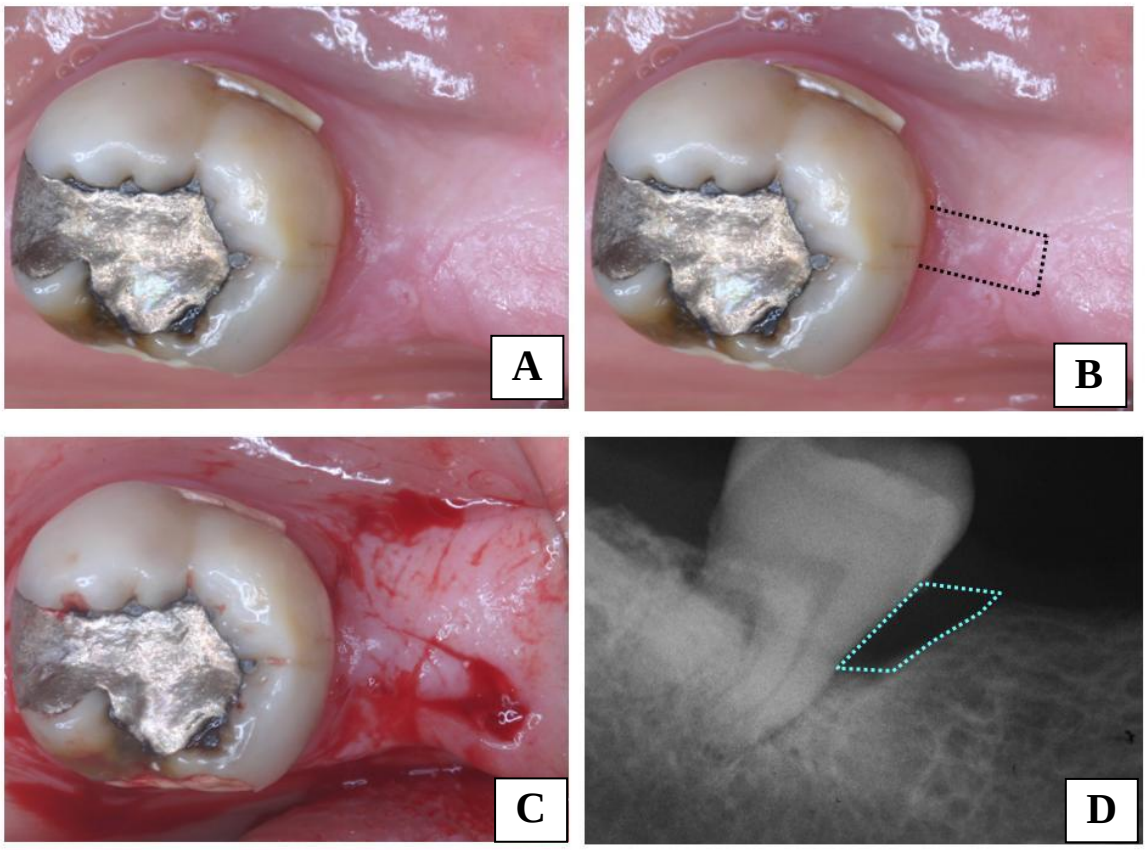


Figura 1: Representação da obtenção de material para as análises em dente isolado. **A**: vista oclusal da região escolhida para a coleta do tecido; **B**: pontilhado representando o desenho das incisões; **C**: desenho de incisões semelhante ao que foi adotado no estudo em cirurgia para outro fim; **D**: imagem radiográfica em que o pontilhado representa o possível formato do tecido que foi coletado.

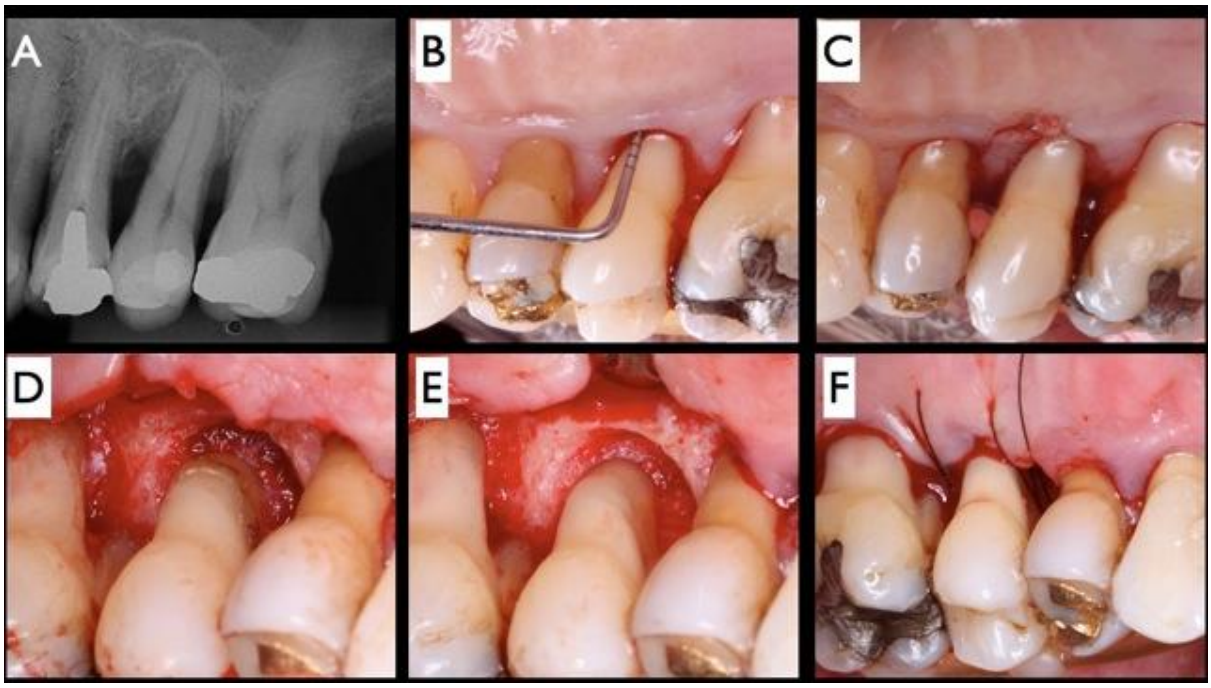


Figura 2: Fotos clínicas de um dos casos operados durante o estudo ilustrando a técnica operatória. **A:** imagem radiográfica da região selecionada para a coleta de tecido gengival (entre os pré-molares); **B:** exame periodontal da área revelando 7 mm de profundidade de sondagem; **C:** incisão delimitando a área de tecido gengival relacionada com a bolsa periodontal; **D:** Retalho de espessura total elevado expondo o cálculo subgengival sobre a superfície radicular; **E:** Aspecto da superfície radicular após raspagem e alisamento radicular; **F:** Suturas reposicionado os tecidos afastados.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Imediatamente após sua coleta, o material removido cirurgicamente foi fixado em formalina a 10%, tamponado pH 7,4 em temperatura ambiente. Os espécimes foram encaminhados ao Laboratório de Histopatologia da FO/UFPel, hemiseccionados e emblocados em parafina. Foram obtidos dois cortes por amostra, na espessura de 3µm, selecionados para a descrição morfológica.

4.4.1.Imunoistoquímica:

De cada bloco de parafina foram obtidos cinco cortes de 3μm estendidos em lâminas de vidro previamente silanizadas. A expressão dos anticorpos CD20, CD45RO, CD68 (tabela 1) foi obtida através da técnica de imunoistoquímica, pelo método da estreptavidina-biotina.

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60ºC por 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. Em seguida reidratados em séries descendentes de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada. Após essa reidratação, foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% durante 10 minutos, para retirada de pigmentos formólicos. Após lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação antigênica para que ocorresse o restabelecimento dos sítios antigênicos e o rompimento das ligações cruzadas com formol.

Os cortes foram novamente lavados em água corrente seguidos de duas passagens de 5 minutos cada em água destilada e do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual foram realizados dois banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes em metanol Pró-Análise (PA) (1:1, v/v). Após o bloqueio, os cortes foram novamente lavados em água corrente seguido de duas passagens por água destilada e, em seguida, dois banhos em solução tampão de TRIS-HCl (hidroximetil-amino-metano) a 0,5M pH 7,6, 5 minutos cada imersão.

Após, procedeu-se a incubação do anticorpo primário segundo a tabela 1. Os cortes foram lavados em solução tampão de TRIS-HCL, 0,5M, pH 7,6, por 5 minutos. Seguiu-se a incubação do soro terciário e complexo terciário (ambos por 30 minutos) - Kit LSAB (Dako Corporation, California). Lavagem duas vezes em água destilada (5 minutos) e em solução tampão TRIS (Tris Hydroxymethyl aminomethane – Sigma Chemical, MO, EUA) pH 7,6. Em seguida, foi feita a revelação da reação através da utilização do cromógeno diaminobenzina (DAB, 3,3 diaminobenzina, Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) por 1 minuto. Após, lavagem em água corrente por 10 minutos, dois banhos em água destilada por 5 minutos cada, e duas imersões de 5 minutos cada em TRIS pH 7,6.

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer por 8 minutos e em seguida lavadas em água corrente por 10 minutos e banhadas em água destilada por 5 minutos.

Após, foram desidratadas através da utilização de cadeias ascendentes de etanóis e diafanizadas em xilol e montadas com resina Permout (Fischer Scientific, Fair Lawn, NY/USA). Os controles positivos foram linfonodos e mucoceles pela observação da marcação dos anticorpos anti-CD20, -CD45RO e -CD68, respectivamente, nos quais foram observadas marcações positivas para as células inflamatórias. O controle negativo foi obtido pela omissão dos anticorpos primários anti-CD20, -CD45RO e -CD68.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados no estudo.

ANTICORPO	***CLONE***	***ESPECIFICIDADE***	***DILUIÇÃO***	***TEMPO DE INCUBAÇÃO***	***TRATAMENTO***
CD20(*)	7D1	Human antigen CD20	1:200 em BSA 1%	60’	Ácido cítrico (pH 6,0), BM 95ºC, 30’
CD68(*)	PG-M1	Human antigen CD68	1:50 em BSA 1%	60’	Ácido cítrico (pH 6,0), BM 95ºC, 30’
CD45RO(**)	UCHL1	Human antigen CD45RO	1:100 em BSA 1%	60’	Ácido cítrico (pH 6,0), BM 95ºC, 30’

BM – banho-maria; (*)Novocastra laboratories Ltd, Newcastle, UK. (**) DakoCytomationDenmark A/S, glostrup, DN.

4.5 CONTAGEM DE CÉLULAS

Realizou-se a contagem de células inflamatórias em todo o tecido conjuntivo fibroso da amostra. A contagem de células foi manual e executada através da observação em microscópio de luz por um único examinador treinado para o estudo (Figura 3).

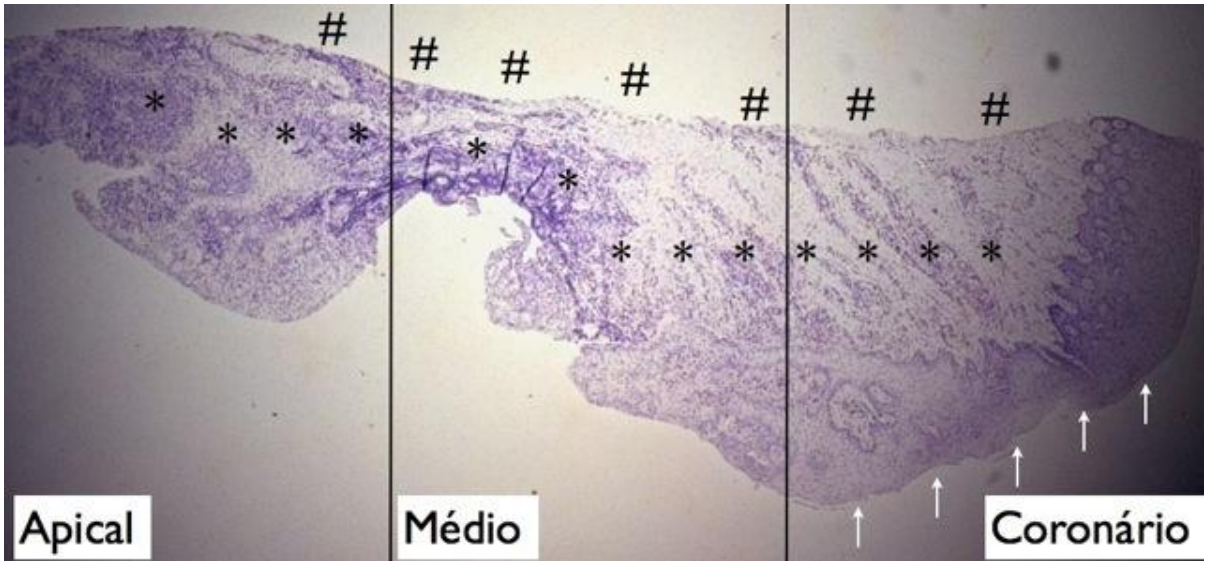


Figura 3: Fotomicrografia de uma amostra corada pela técnica de imunoistoquímica (magnificação 100x). Ilustração esquemática realizada em uma das amostras do presente estudo, mostrando a divisão em terços para a apresentação dos resultados. # representa a porção voltada para o elemento dental; * marca o tecido conjuntivo fibroso no qual as contagens de células foram realizadas e as setas indicam o epitélio de revestimento da mucosa bucal.

4.6 ZIMOGRAFIA

Os espécimes obtidos para zimografia foram lavados após remoção do sítio cirúrgico em PBS e armazenados em um meio de transporte (DMEM) em temperatura ambiente. Para a extração das MMPs, os tecidos foram macerados e incubados em DMEM contendo 40 mg/ml de gentamicina a 37ºC por 24 h. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (6000g X 20 min a 4ºC), os fragmentos de gengiva foram descartados e o meio de cultura condicionado pelas MMPs foi

congelado a -80ºC, até o início dos experimentos de análise da expressão e atividade enzimática.

Para a determinação da atividade proteolítica quantidades iguais de proteína foram misturadas com um volume igual de tampão (2% SDS; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) para então dar-se início à eletroforese. Esta foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,05% de gelatina. Após a separação das enzimas por eletroforese, o gel foi lavado duas vezes em Triton X-100 (2%) por 60 min a temperatura ambiente e então incubado a 37ºC por 24 h em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, contendo 5 mM CaCl2 (Tris-CaCl2). Após a incubação, os géis foram corados com azul de Coomassie G-250 a 0,05% por no mínimo 4 h. A identificação da metaloproteinase marcada no gel de zimografia foi obtida por comparação com o padrão de peso molecular (Perfect Protein™ AP Kit, Novagen, Darmstadt, Germany). A atividade gelatinolítica foi detectada como bandas não coradas no gel. Para avaliar a expressão das MMPs nas diferentes amostras as bandas foram digitalizadas, e os valores de cinza em pixels foram determinados através do programa ImageJ (NIH).

4.7 IDENTIFICAÇÃO DA MMP POR INIBIÇÃO QUÍMICA ESPECÍFICA

Para caracterizar as enzimas presentes no meio condicionado, experimentos paralelos foram realizados. Géis com a expressão das enzimas encontradas foram incubados em tampão de Tris–CaCl2 a 37ºC por 24 h, com a adição de 0,5 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 0,5 mM de NEM (N-etil-maleimida). Em caso de inibição enzimática por EDTA (um conhecido inibidor de MMPs) e não inibição por NEM (um conhecido inibidor de proteinases serinas), as enzimas encontradas no experimento foram caracterizadas como MMPs. Para a identificação dos diferentes tipos de MMPs presentes no gel, um padrão de peso molecular foi adicionado no momento da eletroforese, e por associação, foi determinado o tipo da MMP.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Médias representativas de cada grupo (Fumantes e Não-fumantes) foram obtidas, para cada anticorpo e para cada terço da amostras. Foram comparados o total de células inflamatórias em cada grupo, o total de células inflamatórias em cada terço da amostra e a presença de cada tipo celular em cada terço. Os dados foram agrupados para permitir as comparações propostas. Em seguida um teste de normalidade foi aplicado e para os dados que apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste t não pareado (α=0,05). Nos casos sem distribuição normal o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado (α=0,05). O teste de Mann-Whitney foi utilizado apenas para comparar os grupos marcados com anti-CD45RO no terço médio e anti-CD68 no terço cervical.

5. RESULTADOS

A pesquisa foi executada nas dependências da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO/UFPel), desde a seleção de casos, procedimentos clínicos, bem como o trabalho laboratorial.

Os valores médios para os parâmetros clínicos avaliados entre fumantes e não-fumantes estão descritos nas tabelas 2 a 6 e figuras 4 a 8.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão para os parâmetros clínicos nos sítios selecionados e dados demográficos em fumantes e não-fumantes.

	Pacientes fumantes *(n=15, sítios 15)*	Pacientes não-fumantes *(n=16, sítios 16)*
Idade (anos) média ± DP	46,4 (±7,7)	42,28 (±6,7)
Variação [mínimo – máximo]	[32 – 63]	[32 – 61]
Gênero (%)	F= 8/15 M=7/15 53,3% 46,6%	F= 11/16 M= 5/16 68,75% 31,25%
Profundidade de sondagem (mm) média ±DP	7,9 (±1,2)	7,8 (±1,4)
Variação [mínimo – máximo]	[6 – 10]	[6 – 11]
Índice de placa – IP (%)	0%	0%
Índice gengival – IG (%)	100%	100%
Perda de inserção (mm) média ±DP	7,4 (±2,16)	7,5 (±1,6)
Variação [mínimo – máximo]	[5 – 13]	[5 – 10]
Consumo de cigarros/dia	17 (±4,14)	- -
Variação [mínimo – máximo]	[10-20]	
Tempo de Tabagismo (em anos)	22,9 (±12,92)	
Variação [mínimo – máximo]	[5 – 52]	- -

5.2 – Resultados Imunoistoquímicos e Histométricos

As fotomicrografias foram obtidas através da utilização de uma câmera digital (SV Micro, Sound Vision Inc., EUA) acoplada ao microscópio óptico (Axioskop 2 Plus, Carl-Zeiss, GMBH, Alemanha) e um computador (Pentium 4, Intel Brazil, Brasil) com um software Axio Vision 3.0 (Carl-Zeiss Microimaging GMBH, Alemanha).

Toda a faixa de tecido conjuntivo fibroso presente em cada uma das amostras foi avaliada imunoistoquimicamente e histometricamente em relação à quantidade de células marcadas para cada um dos anticorpos (anti-CD20, anti-CD45RO e anti-CD68). Os resultados da avaliação da amostra, como um todo, estão apresentados na tabela 2 e estão divididos em: Somatória do número de células CD20 positivas, CD45RO positivas e CD68 positivas em toda a amostra, número de células CD20 positivas em toda a amostra, número de células CD45RO positivas em toda a amostra e número de células CD68 positivas em toda a amostra. Ao comparar os valores médios dos pacientes fumantes e dos não-fumantes observou-se que não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes (p>0,05) para nenhum dos parâmetros avaliados na amostra como um todo.

Tabela 3: Médias e desvios padrões do número de células marcadas para cada um dos anticorpos anti-CD20, anti-CD45RO e anti-CD68, em cada grupo experimental, considerando todo o tecido conjuntivo das amostras.

Parâmetro	**Não-Fumante** Média ± Desvio Padrão	**Fumante** Média ± Desvio Padrão	*P*
Somatória de CD-20 + CD-45RO + CD-68	942,56 ± 1196,11	894,4 ± 765,02	0,267
Total de CD-20	173,25 ± 330,35	162,27 ± 171,20	0,745
Total de CD-45RO	614,31 ± 901,82	586,6 ± 626,38	0,887
Total de CD-68	155 ± 182,78	145,53 ± 106,4	0,174

P<0,05 representa uma diferença estatisticamente significante entre os grupos

Resultados semelhantes foram observados ao avaliar a presença de células positivas para cada um dos anticorpos em cada terço da amostra (cervical, médio e apical). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes (p>0,05) ao comparar fumantes e não-fumantes (tabelas 3, 4 e 5). As figuras 3, 4, 5 e 6 são fotomicrografias representativas das amostras avaliadas no presente estudo. Estas

figuras ilustram o padrão imunoistoquímico obtido e a grande variação de presença/ausência de células positivas observada na presente amostra experimental. Tal variação pode estar associada à ausência de diferenças estatisticamente significantes, uma vez que os desvios padrões obtidos foram considerados altos para todas as comparações realizadas.

Tabela 4: Médias e desvios padrões do número de células positivas para o anticorpo anti-CD20 em cada terço do tecido coletado (cervical, médio e apical), para cada um dos grupos experimentais.

CD-20			
Região da Amostra (Terço)	**Não-Fumante** Média ± Desvio Padrão	**Fumante** Média ± Desvio Padrão	*P*
Cervical	21,31 ± 21,57	22,4 ± 38,10	0,36
Médio	56,5 ± 88,12	58,46 ± 70,25	0,995
Apical	95,43 ± 249,67	81,4 ± 89,98	0,396

P<0,05 representa uma diferença estatisticamente significante entre os grupos

Tabela 5: Médias e desvios padrões do número de células positivas para o anticorpo anti-CD45RO em cada terço do tecido coletado (cervical, médio e apical), para cada um dos grupos experimentais.

CD-45RO			
Região da Amostra (Terço)	**Não-Fumante** Média ± Desvio Padrão	**Fumante** Média ± Desvio Padrão	*P*
Cervical	54,93 ± 85,84	71,27± 70,01	0,724
Médio	227,25 ± 335,56	160,06 ± 167,18	0,77
Apical	332,12 ± 549,18	335,26 ± 500,17	0,726

P<0,05 representa uma diferença estatisticamente significante entre os grupos

Tabela 6: Médias e desvios padrões do número de células positivas para o anticorpo anti-CD68 em cada terço do tecido coletado (cervical, médio e apical), para cada um dos grupos experimentais.

CD-68			
Região da Amostra (Terço)	**Não-Fumante** Média ± Desvio Padrão	**Fumante** Média ± Desvio Padrão	*P*
Cervical	53,37 ± 89,73	25,2 ± 23,81	0,953
Médio	62,81 ± 94,98	60,00 ± 61,82	0,261
Apical	38,81 ± 40,20	60,33 ± 54,32	0,618

P<0,05 representa uma diferença estatisticamente significante entre os grupos

Figura 4: Fotomicrografias do terço coronário (magnificação de 100x e 400x) de uma das amostras de não-fumante positivas para o anticorpo anti-CD20.

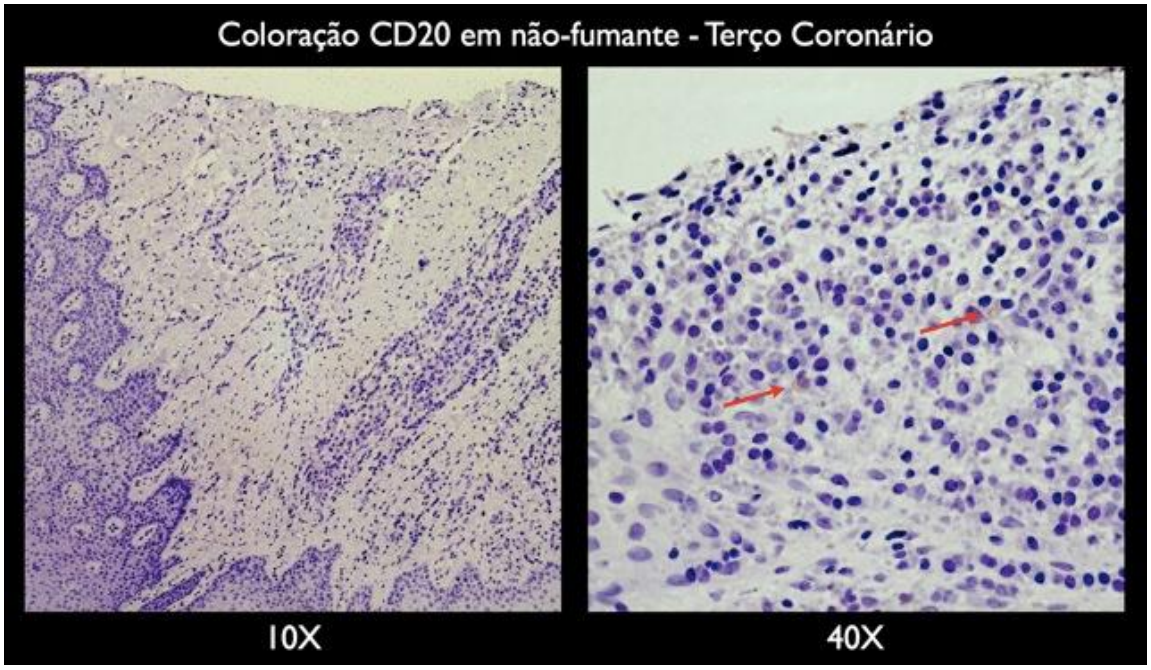


Figura 5: Fotomicrografias do terço coronário (magnificação de 100x e 400x) de uma das amostras de fumante positivas para o anticorpo anti-CD45RO.

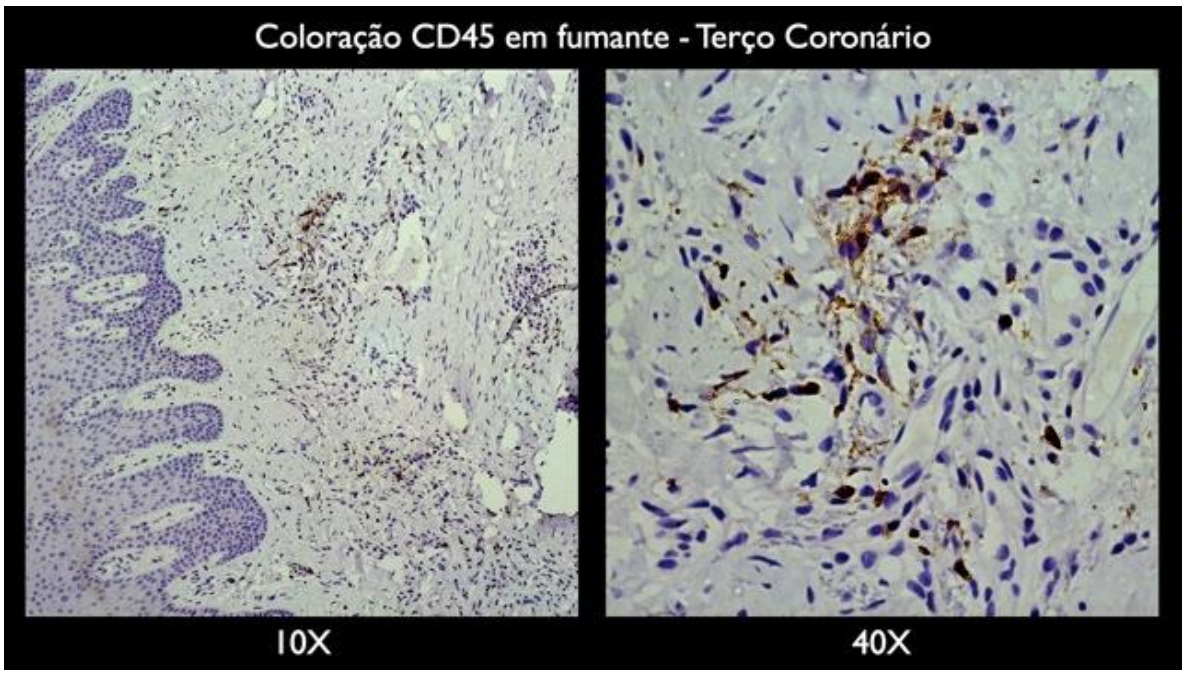


Figura 6: Fotomicrografias do terço médio (magnificação de 100x e 400x) de uma das amostras de não-fumante positivas para o anticorpo anti-CD68.

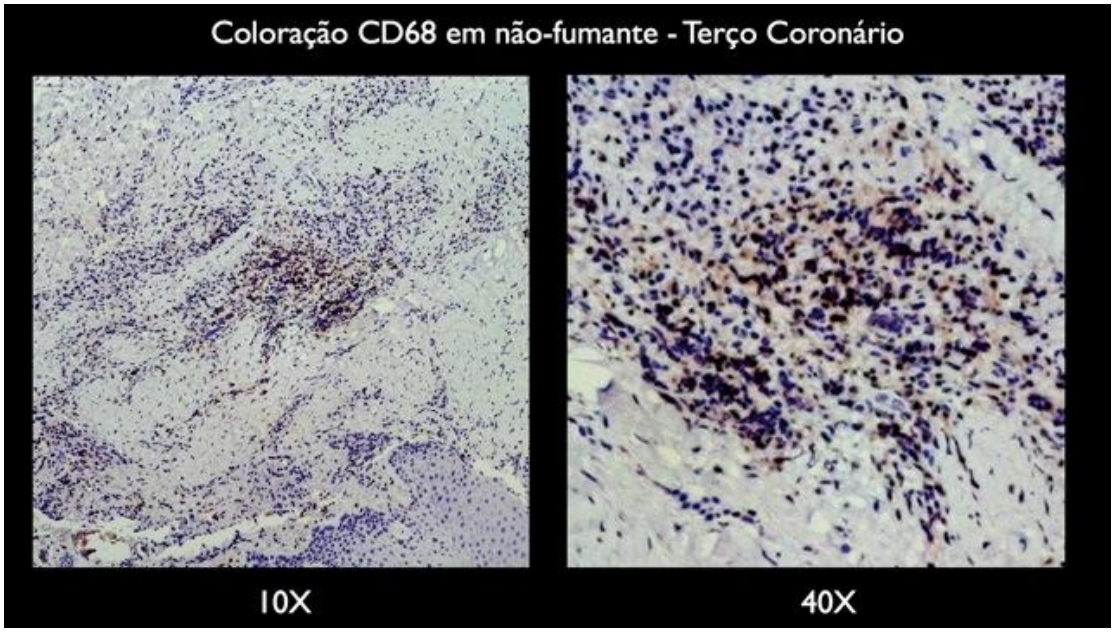
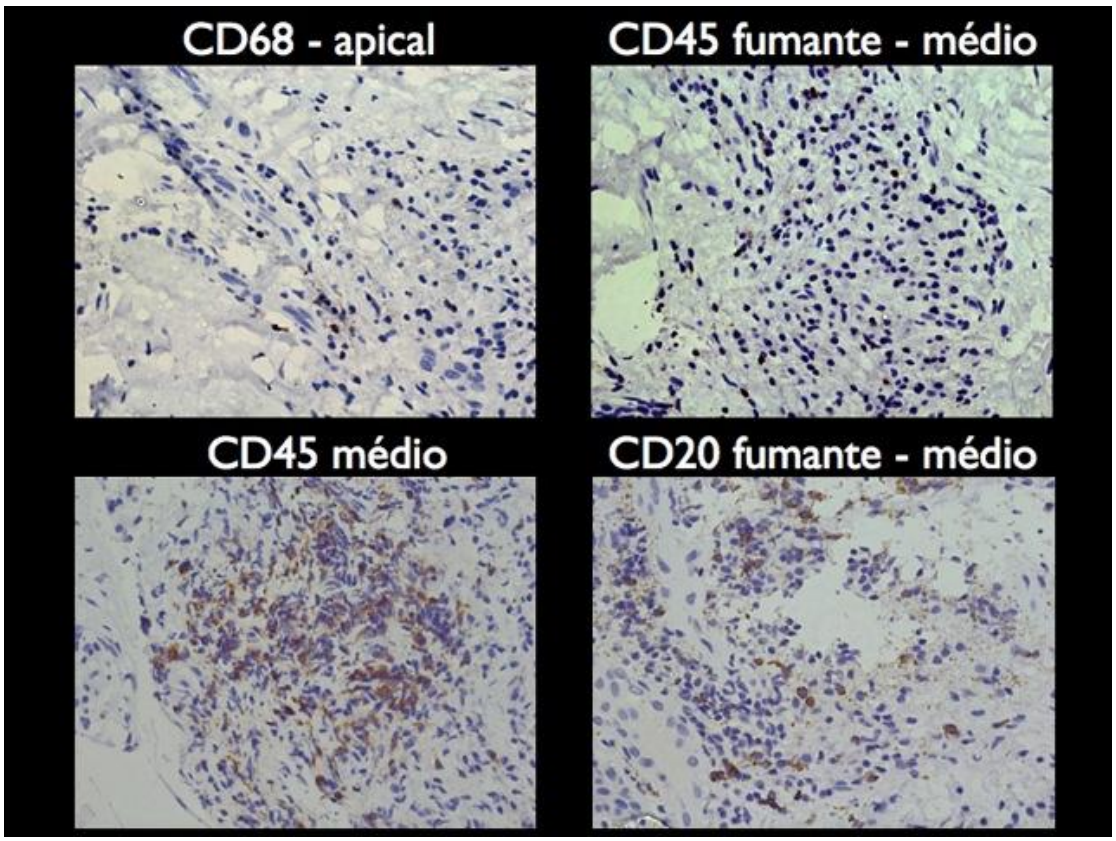


Figura 7 – Quadro ilustrativo mostrando (magnificação de 400X) diversos padrões de marcação imunoistoquímica obtidos no presente estudo.



5.3 – Resultados da Zimografia

Embora a zimografia seja um método semi-quantitativo e sujeito a variáveis, os resultados das amostras utilizadas no presente estudo sugerem que não existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP-2 e MMP-9 nas amostras colhidas de bolsas periodontais de fumantes e não-fumantes.

Na comparação dos valores obtidos na expressão da MMP-9 em fumantes e não-fumantes (tabela 7), não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados (p=0,180).

Tabela 7. Comparação entre as MMP-9 entre os grupos de não-fumantes e fumantes.

Grupo	N	Missing	Media	Desvio Padrão
MMP-9 NF	14	0	1,505	1,067
MMP-9 F	15	0	1,052	0,676

t = 1,375 with 27 degrees of freedom. (P = 0,180)

Na avaliação dos valores obtidos na expressão da MMP-2 em fumantes e não-fumantes (tabela 8), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (p = 0,948).

Tabela 8. Comparação entre as MMP-2 entre os grupos de não-fumantes e fumantes.

Grupo	N	Missing	Media	25%	75%
MMP-2 NF	14	0	0,0725	0,000	0,784
MMP-2 F	15	0	0,223	0,000	0,726

T = 208,000 (P = 0,948)

Na avaliação dos valores obtidos para a atividade gelatinolítica (MMP-2 + MMP-9) entre os grupos de fumantes e não fumantes (tabela 9), não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (p = 0,674).

Tabela 9. Comparação da atividade gelatinolítica entre os grupos de não-fumantes e fumantes.

Grupo	N	Missing	Media	25%	75%
NF	28	0	0,759	0,0560	1,849
F	30	0	0,631	0,223	1,041

T = 853,500 (P = 0,674)

Figura 8. Ilustração da expressão das MMPs na marcação no gel durante o ensaio de Zimografia dos espécimes relativos a pacientes fumantes.

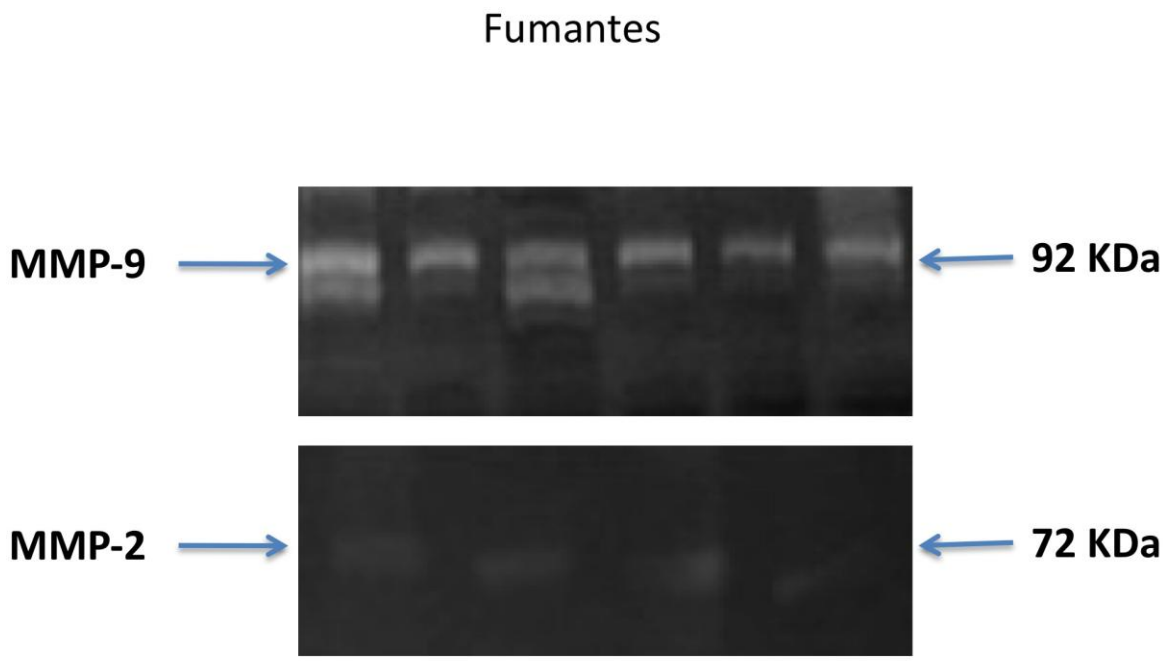
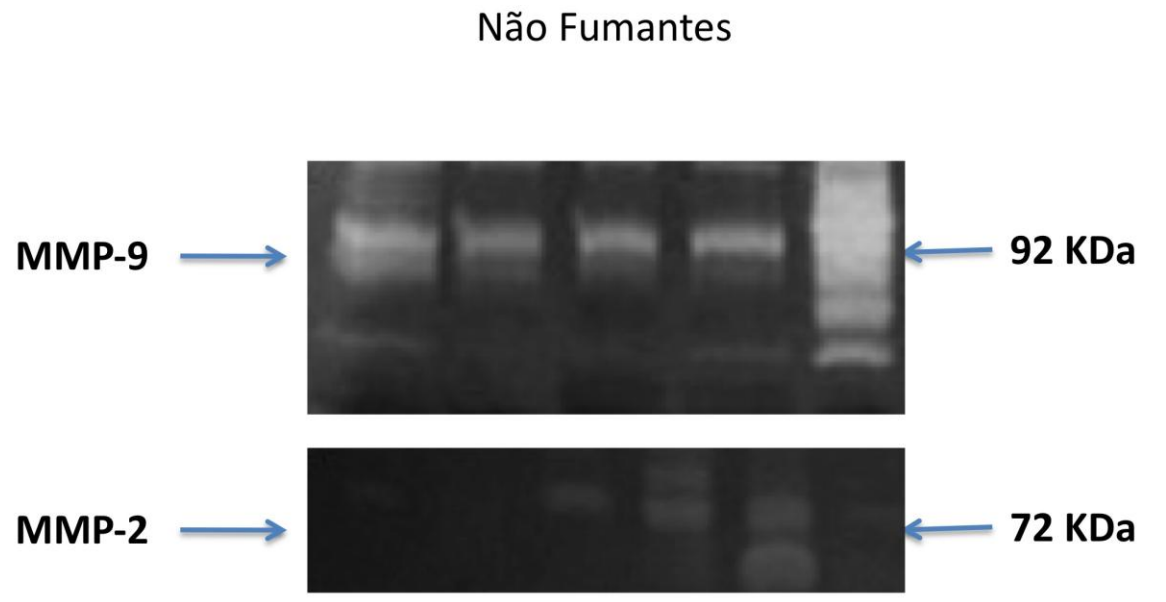


Figura 9. Ilustração da expressão das MMPs na marcação no gel durante o ensaio de Zimografia dos espécimes relativos a pacientes não-fumantes.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a realizar uma análise histológica e imunoistoquímica de biópsias de fumantes e não-fumantes na tentativa de estabelecer algum padrão de distribuição, concentração ou quantidade total de células que pudesse justificar a maior perda de inserção periodontal observada em fumantes. Dentro da metodologia utilizada, os resultados obtidos não puderam justificar, nem ao menos em parte, a maior perda de inserção observada nos fumantes. Entretanto, ao fazer uma paralelo entre os resultados do presente estudo e os resultados de investigações anteriores, que também avaliaram biópsias de bolsa periodontal de fumantes (Cesar Neto et al., 2006 e 2007), podemos sugerir que os componentes do cigarros estimulam as células inflamatórias da lesão periodontal de fumantes a produzirem uma resposta inflamatórias favorável a degradação tecidual e esta resposta está relacionada do tipo de mediadores inflamatórios produzidos no local e não a quantidade de células inflamatórias presentes.

Alguns estudos já tentaram estabelecer uma relação entre os tipos celulares presentes e as características da lesão inflamatória. Entretanto, os limites entre periodontite/gengivite e as características da lesão ativa ainda não estão totalmente elucidados. Sabe-se que os linfócitos desempenham um papel fundamental na patogênese da periodontite. A natureza da resposta imune adaptativa é controlada pelas células-T que, por sua vez, regulam a produção de células-B e anticorpos. As células-T produzem muitos mediadores entre eles InF-ϒ, IL-1,2,4,5,6 e 13, RANK-L, moléculas de adesão e quimoquinas. Todos estes mediadores têm funções que podem direcionar a resposta imune, inata e adaptativa, na periodontite e estas respostas podem estimular a reabsorção óssea tanto direta como indiretamente (LOOS et al., 2004; GEMMEL e SEYMOUR, 2004). Em estudo de Loos et al., 2004, foi observado que a proliferação de células-T foi maior nos pacientes fumantes pesados e mais baixa nos pacientes não-fumantes. Os autores concluíram que o aumento no número de células-T e a elevada resposta destas células em pacientes fumantes pode ser uma das explicações do fumo como um fator de risco para a periodontite. Porém, mais estudos ainda são necessários, pois o estudo de Loos et al., 2004, avaliou sangue periférico (venoso). A capacidade proliferativa das células T foi determinada em ensaios de cultura de linfócitos em sangue total (whole-blood), sendo usadas medidas padrão de análises clínicas para a quantificação e citometria de fluxo para determinar a diferenciação dos linfócitos. A utilização de diferentes técnicas, tipo de tecido e condição do mesmo podem explicar a diferença nos resultados, quando comparado ao presente estudo.

Utilizando análise imunoistoquimica (anticorpos anti-CD4, -CD20 e -CD68) para avaliar a densidade das células inflamatórias mononucleares em pacientes com gengivite crônica (GC) e periodontite crônica (PC), Lins et al., 2008, observaram que as células CD4+ e as CD68+ exibiram distribuição difusa no tecido conjuntivo e as células CD20+ predominantemente em grupos. O estudo não identificou diferença estatística em relação à densidade das células CD4+ e CD20+ nas diferentes doenças avaliadas. Porém encontrou diferença na densidade de células CD68+ entre os grupos. Também foi observado que a densidade de macrófagos foi maior no grupo GC e o nível de ativação celular do infiltrado foi maior na PC, sem haver diferença na densidade de linfócitos T e B nestes grupos.

Apesar de ter sido utilizada metodologia semelhante (análise imunoistoquimica) algumas diferenças devem ser observadas. No estudo de Lins et al., 2008, foi avaliada a presença de células CD4+ (linfócitos T helper). Já em nosso estudo foram avaliadas células CD45RO+ (linfócitos T – PAN). Também devemos atentar para a diferença encontrada na densidade de macrófagos (células CD68+) entre os grupos estudados por Lins et al., 2008. Os grupos apresentavam doenças periodontais diferentes (GC e PC). Nosso estudo avaliou pacientes com o mesmo padrão de doença periodontal (periodontite) tendo o hábito de fumar como variável.

Em nosso estudo os resultados observados mostraram que não houve diferença estatistica quando foram avaliadas as células CD20+ entre os grupos de fumantes e não-fumanates. Não foram encontradas diferenças estatísticas no número de céllulas CD45RO+ entre fumantes e não-fumantes. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre fumantes e não-fumantes em relação às células CD68+.

O presente estudo também avaliou a presença de duas metaloproteinases do grupo da gelatinases, MMP-2 e MMP-9, em amostras de tecido periodontal de pacientes fumantes e não-fumantes com periodontite, através da técnica de zimografia. As metaloproteinases são a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, além de serem capazes de degradar todas as proteínas da matriz extracelular (SOUZA e LINE, 2002; BIRKEDAL-HANSEN, 1993). As proteinases ou metaloproteinases da matriz (MMPs) participam enormemente tanto na degradação como na remodelação das proteínas da matriz extracelular durante os processos fisiológicos e patológicos. Estas enzimas estão associadas aos processos inflamatórios patológicos, como o da doença periodontal, resultando na destruição do tecido periodontal (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Bandas com marcação positiva para as MMP-2 e MMP-9 foram detectadas tanto para o grupo dos fumantes como para os não-fumantes. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significantes ao comparar os dois tipos

de moléculas, nos dois grupos, algumas tendências numéricas merecem ser destacadas, principalmente se considerarmos o caráter semi-quantitativo da zimografia. Apesar de valores numéricos de atividade gelatinolítica total bem semelhante entre os grupos, a MMP-9 parece estar mais relacionada com a atividade gelatinolítica no grupo de não-fumantes, com valores numéricos cerca de 50% maior nesse grupo. Diferenças numéricas mais abruptas foram ainda observadas para a MMP-2, que apresentou valores numéricos cerca de três vezes maiores nos fumantes. Este resultado é bastante semelhante ao obtido previamente em ratos, pois no estudo em modelo animal realizou-se apenas uma análise visual dos géis, não se levando em consideração testes estatísticos. Estes resultados sugerem um envolvimento da MMP-2 na maior progressão e incidência de doença periodontal em fumantes.

Alguns autores mostraram que a quantidade de gelatinases é elevada durante o processo da doença periodontal e que o tratamento convencional, reduz significativamente o nível destas enzimas, sugerindo que a MMP-2 e a MMP-9 participam ativamente da destruição tecidual na periodontite (MÄKELÄ et al., 1994). A destruição dos tecidos periodontais tem como fator adicional, além do seu caráter multifatorial, o desequilíbrio das MMPs e seus inibidores teciduais (MENEZES, 2009).

Para Genco (1992) e Granier e Mayrand (2001) está claro que as bactérias do biofilme são capazes de ativar diretamente as MMPs ou inibir seus TIMPs e ainda indiretamente estimular as células do hospedeiro a produzir citocinas que podem induzir outras células (fibroblastos e ceratinócitos) a produzirem colagenases. Após análise por eletroforese os autores concluem que a degradação periodontal pode ser favorecida pelo aumento significante de MMPs ativas, causada pela redução de seus TIMPs, nos sítios com presença de *Porphyromonas gingivalis*. Níveis elevados de MMPs têm sido observados na literatura como participante no processo inflamatório em pacientes com periodontite (WOESSNER, 1994; MILLER, 2006; RAI, 2008), contudo pouca relação tem sido descrita em pacientes fumantes ou não fumantes, portadores de doença periodontal crônica, o que ressalta a importância do presente estudo.

Apesar das interessantes informações produzidas neste estudo, mais estudos são necessários na tentativa de se esclarecer as principais moléculas envolvidas na patogênese da doença periodontal em fumantes. Estudos avaliando a localização dessas moléculas dentro da lesão periodontal também são importantes, pois podem dar mais força aos achados obtidos com outras metodologias. Alem disso, o presente trabalho parece confirmar dados prévios obtidos em modelo animal, enfatizando a MMP-2 como uma molécula potencialmente chave dentro da destruição tecidual na periodontite em fumantes. Estes achados dão margem para a

utilização de terapias alternativas para controlar a perda de inserção periodontal em fumantes, principalmente nos casos refratários, uma vez que segundo Magnusson et al., (1994), cerca de 90% destes casos ocorrem em fumantes.

7. CONCLUSOES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

I. A quantidade total de células inflamatórias mononucleares marcadas não diferiu estatísticamente entre fumantes e não-fumantes ($p>0,05$). Ao avaliar cada tipo celular separadamente, também não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$). Ao dividir as amostras em regiões (terço coronal, médio e apical) e avaliar a presença de cada tipo celular em cada uma das regiões também não foram detectadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p>0,05$).

II. A zimografia das amostras sugere que a expressão de MMP-2 e 9 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. Assim, dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que os sítios com periodontite crônica de fumantes e não-fumantes não diferem em relação à quantidade de células inflamatórias mononucleares e na expressão de MMPs 2 e 9.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAP 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.1-112, 1999.

2. ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre : Artes Médicas, 1997. Cap. 19: Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular, p. 949-1009.

3. AXELSSON, P.; PAULANDER, J.; LINDHE, J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, n.4, p.297-305,1998.

4. BERGSTROM, J.; ELIASSON, S.; DOCK, J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. **Journal of Periodontology**, v.71, n.8, p.1338-47, 2000.

5. BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matriz metalloproteinases in human periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v.64, n.5, p. 474-484, 1993.

6. CESAR NETO, J.B.; DE SOUZA, A.P.; BARBIERI, D.; MORENO, H. JR.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. JR. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. **Journal of Periodontology**, v.75, n.7, p.995-1000, 2004.

7. CESAR-NETO, J.B.; DUARTE, P.M.; DE OLIVEIRA, M.C.; CASATI, M.Z.; TAMBELI, C.H.; PARADA, C.A.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. JR. Smoking modulates interferon-gamma expression in the gingival tissue of patients with chronic periodontitis. **European Journal of Oral Sciences**, v.114, n.5, p.403-8, 2006.

8. CESAR-NETO, J.B.; DUARTE, P.M.; DE OLIVEIRA, M.C.; TAMBELI, C.H.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. JR. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-

10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. **Journal of Periodontal Research**, v.42, n.2, p.184-91, 2007.

9. CHANG, Y.C.; YANG, S.F.; LAI, C.C.; LIU, J.Y.; HSIEH, Y.S. Regulation of matriz metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. **Journal of Periodontal Research**, v.37, n.3, p. 97-102, 2002.

10. DARBY, I.B.; HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction **Journal of Clinical Periodontology**. v.27, n.6, p.417-24, 2000.

11. De SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.10, n.1, p.1-6, 2002.

12. EL-GHORAB, N.M.N.; GENCI, R.; DZIAK, R. Effect of nicotine and estrogen on IL-6 release from osteoblasts. **Journal of Dental Research**, v.76, p.341, 1997.

13. FREDRIKSSON, M.I.; FIGUEREDO, C.M.; GUSTAFSSON, A.; BERGSTROM, K.G.; ASMAN, B.E. Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins. Journal of Periodontology, v.70, p.1355-1360, 1999.

14. GEMMEL, E.; SEYMOUR, G.J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v.35, p.21-41, 2004.

15. GENCO, R.J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **Journal of Periodontology**, v.63, p. 338-355, 1992.

16. GOMES, S.C.; PICCININ, F.B.; OPPERMANN, R.V.; SUSIN, C.; NONNENMACHER, C.I.; MUTTERS, R.; MARCANTONIO, R.A. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. **Journal of Periodontology**, v.77, n.9, p.1483-90, 2006.

17. GOMES, S.C.; NONNENMACHER, C.; SUSIN, C.; OPPERMANN, R.V.; MUTTERS, R.; MARCANTONIO, R.A.C. The effect of supragengival plaque-

control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase Caín reaction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 12, p. 2297-2304, 2008.

18. GRENIER D, MAYRAND D. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by Porphyromonas gingivalis. **FEMS Microbiol Letters**. v.203, n.2, p.161-4, 2001

19. GROSSI, S.G.; ZAMBON, J.J.; HO, A.W.; KOCH, G.; DUNFORD, R.G.; MACHTEI, E.E.; NORDERYD, O.M.; GENCO, R.J. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **Journal of Periodontology**, v.65, p.260-267, 1994.

20. HAAKE, S.K.; NEWMAN, M.G.; NISENGARD, R.J.; SANZ, M. Microbiologia da doença periodontal. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**, 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.6, p.86-100, 2004.

21. HAAKE, S.K.; NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G.; MIYASAKI, K.T. Interações microbianas com o hospedeiro nas doenças periodontais. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**, 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.8, p.118-136, 2004.

22. HABER, J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. **Current Opinion Periodontology**. p.12-8, 1994.

23. KERDVONGBUNDIT, V.; WIKESJO, U.M. Prevalence and severity of periodontal disease at mandibular molar teeth in smokers with regular oral hygiene habits. **Journal of Periodontology**, v.73, n.7, p.735-40, 2002.

24. KRAAL, J.H.; KENNEY, E.B. The response of polymorphonuclear leukocytes to chemotactic stimulation for smokers and non-smokers. **Journal of Periodontal Research**, v.14, n.5, p.383-9, 1979.

25. KOMMAN, K.S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **Journal of Periodontology**, v.79, p.1560-68, 2008.

26. KUBOTA, Y.; NINOMIYA, T.; OKA, S.; TAKENOSHITA, Y.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1α-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)

secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. **Journal of Dental Research**, v.79, n.6, p.1423-1430, 2000.

27. KUBOTA, Y.; OKA, S.; NAKAGAWA, S.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1α enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenickeratocyst fibroblasts. **Journal of Dental Research**, v.81, n.1, p.23-27, 2002.

28. LAPPIN, D.F.; SHERRABEH, S.; JENKINS, W.M.; MACPHERSON, L.M. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v.34, n.4, p.271-7, 2007.

29. LAPPIN, D.F.; KOULOURI, O.; RADVAR, M.; HODGE, P.; KINANE, D.F. Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. **Journal of Clinical Periodontology**, v.26, n.3, v.183-9, 1999.

30. LINDEN, G.J.; MULLALLY, B.H. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. **Journal of Periodontology**, v.65, n.7, p.718-23,1994.

31. LINS, R.D.A.U.; FIGUEIREDO, C.R.L.V.; QUEIROZ, L.M.G.; SILVEIRA, E.J.D.; GODOY, G.P.; FREITAS, R.A. Immunohistochemical evaluation of the inflammatory response in periodontal disease. Brazilian Dental Journal, v.19, n.1, p.9-14, 2008.

32. LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology,** v.36, p.177-187,1965.

33. LÖE, H.; ANERUD, A.; BOYSEN, H.; SMITH, M. The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. **Journal of Periodontology,** v.49, p.607-620, 1978.

34. LÖE, H.; ANERUD, A.; MORRISON, E. Natural history of periodontal disease in man. Rapad, moderate and no loss of attachment in Sri Lanka laborers 14 to46 years of age. **Journal of Clinical Periodontology,** v.13, p.431-445, 1986.

35. LOOS, B.G.; ROOS, M.T.L.; SCHELLEKENS, P.Th.A.; VAN DER VELDEN, U.; MIEDEMA, F. Lymphocyte numbers and function in relation to periodontitis and smoking. **Journal of Periodontology**, v.75, p.557-564,2004.

36. MACFARLANE, G.D.; HERZBERG, M.C.; WOLFF, L.F.; HARDIE, N.A. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. **Journal of Periodontology**, v.63, n.11, p.908-13, 1992.

37. MAGNUSSON, I.; LOW, S.B.; MCARTHUR, W.P.; MARKS, R.G.; WALKER, C.B.; MARUNIAK, J.; TAYLOR, M.; PADGETT, P.; JUNG, J.; CLARK, W.B. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.21, n.9, p.628-37, 1994. Erratum in: **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, n.2, p.183, 1995.

38. MAGNUSSON, I.; WALKER, C.B. Refractory periodontitis or recurrence of disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.23, p.289-92, 1996.

39. MÄKELA, M.; SALO, T.; UITTO, V.J.; LARJAVA, H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: Cellular origin and relationship to periodontal statu. **Journal of Dental Research**, v.73, n.8, p.1397-1406, 1994.

40. MARIGGIO, M.A.; GUIDA, L.; LAFORGIA, A.; SANTACROCE, R.; CURCI, E.; MONTEMURRO, P.; FUMARULO, R. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? **Journal of Periodontal Research**, v.36, n.1, p.32-9, 2001.

41. MENEZES, D.J.B.; CARVALHO, V.G.; GROMATZKY, A.; JAHN, R.S.; SENDYK, W.R. The influence of matrix metalloproteinases in periodontal and peri-implantar disease. **Odontologia Clínica Científica**, v.8, n.2, p.99-103, 2009.

42. MOIMAZ, S.A.S.; ZINA, L.G.; SALIBA, O.; GARBIN C.A.S. Smoking and periodontal disease: Clinical evidence for an association. **Oral Health and Preventive Dentistry**, v.7, n.4, p. 369-376, 2009.

43. MOROZUMI, T.; KUBOTA, T.; SUGITA, N.; ITAGAKI, M.; YOSHIE, H. Alterations of gene expression in human neutrophils induced by smoking cessation. **Journal of Clinical Periodontology**, v.31, p.1110-1116, 2004.

44. NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matriz metalloproteinases in tumor invasión: role for cell migration. **Pathology Internacional**, v.52, p.255-264, 2002.

45. NOBLE, R.C.; PENNY, B.B. Comparison of leukocyte count and function in smoking and nonsmoking young men. **Infect Immun**, v.12, n.3, p.550-5, 1975.

46. OUYANG, Y.; VIRASCH, N.; HAO, P.; AUBREY, MT.; MUKERJEE, N.; BIERER, BE.; FREED, BM. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.106, p.280-287, 2000.

47. PABST, M.J.; PABST, K.M.; COLLIER, J.A.; COLEMAN, T.C.; LEMONS-PRINCE, M.L.; GODAT, M.S.; WARING, M.B.; BABU, JP. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. **Journal of Periodontology**, v.66, n.12, p.1047-55, 1995.

48. PAGE, R.C.; KOMMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. **Periodontology 2000**, v.14, p.9-11, 1997.

49. PATTAMAPUN, K.; TIRANATHANAGUL, S.; YONGCHAITRAKUL, T.; KUWATANASUCHAT, J.; PAVASANT, P. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. **Journal of Periodotal Research**, v.38, p.115-121, 2003.

50. PAYNE, J.B.; JOHNSON, G.K.; REINHARDT, R.A.; DYER, J.K.; MAZE, C.A.; DUNNING, D.G. Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. **Journal of Periodontal Research**, v.31, n.2, p.99-104, 1996.

51. PEREIRA, A.L.A.; VERAS, S.S.L.; SILVEIRA, E.J.D.; SEABRA, F.R.G.; PINTO, L.P.; SOUZA, L.B.; FREITAS, R.A. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço:

uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringología**, v.71, n.1, p.81-86, 2005.

52. PETROPOULOS, G.; MCKAY, I.J.; HUGHES, F.J. The association between neutrophil numbers and interleukin-1alpha concentrations in gingival crevicular fluid of smokers and non-smokers with periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.31, p.390-395, 2004.

53. PREBER, H.; BERGSTROM, J.; LINDER, L.E. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v.19, p.667-71, 1992.

54. QUINN, S.M.; ZHANG, J.B.; GUNSOLLEY, J.C.; SCHENKEIN, H.A.; TEW, J.G. The influence of smoking and race on adult periodontitis and serum IgG2 levels. **Journal of Periodontology**, v.69, n.2, p171-7, 1998.

55. REYNOLDS, J.J.; MEIKLE, M.C. Mechanism of connective tissue matriz destruction in periodontitis. **Periodontology 2000**, v.14, p.144-157, 1997.

56. RUNDHAUG, J.E. Matriz metalloproteinases, angiogenesis and cancer. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.551-554, 2003.

57. RYDER, M.I.; FUJITAKI, R.; JOHNSON, G.; HYUN, W. Alterations of neutrophil oxidative burst by in vitro smoke exposure: implications for oral and systemic diseases. **Annal of Periodontology**, v.3, n.1, p.76-87, 1998.

58. RYDER, M.I.; SAGHIZADEH, M.; DING, Y.; NGUYEN, N.; SOSKOLNE, A. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta from peripheral blood mononuclear cells. **Oral Microbiol Immunology**, v.17, n.6, p.331-6, 2002.

59. RYDER, M.I.; HYUN, W.; LOOMER, P.; HAQQ, C. Alteration of gene expression profiles of peripheral mononuclear blood cells by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. **Oral Microbiol Immunology**, v.19, n.1, p.39-49, 2004.

60. RYDER, M.I. The influence of smoking on host response in periodontal infections. **Periodontology 2000**, v.43, p.267-277, 2007.

61. SCABBIA, A.; CHO, K.S.; SIGURDSSON, T.J.; KIM, C.K.; TROMBELLI, L. Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. **Journal of Periodontology**, v.72, n.1, p.43-9, 2001.

62. SEYMOUR, G.J. Posible mechanisms envolved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 66, p. 2-9, 1987.

63. SHILOAH, J.; PATTERS, M.R.; WARING, M.B. The prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers. **Journal of Periodontology**, v. 71, n.4, p. 562-567, 2000.

64. SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.6, p. 351-382, 1979

65. SMITH, P.C.; MUÑOZ, V.C.; COLLADOS, L.; OYARZÚN, A.D. *In situ* detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival ephitelium in human periodontal disease. **Journal of Periodontal research**, v.39, n.2, p. 87-92, 2004.

66. SOCRANSKY, S.S.; HAFFGEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT Jr., R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, p.134-144, 1998.

67. SOELL, M.; ELKAIM, R.; TENENBAUM, H. Cathepsin C, matriz metalloproteinases and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients **Journal of Dental Research**, v.83, n.3, p.174-178, 2002.

68. SORSA, T.; TJÃDERHANE, L.; SALO, T. Matriz metalloproteinases in oral diseases. **Oral Diseases**, v.10, p.311-318, 2004.

69. STAMENKOVIC, I. Matriz metalloproteinases in tumor invasión and metastases. **Cancer Biology**, v.10, p.415-433, 2000.

70. STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matriz metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review on Cell Development and Biology**, v.17, p.463-516, 2001.

71. STOLTENBERG, J.L.; OSBORN, J.B.; PIHLSTROM, B.L.; HERZBERG, M.C.; AEPPLI, D.M.; WOLFF, L.F.; FISCHER, G.E. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. **Journal of Periodontology**, v.64, n.12, p.1225-30, 1993.

72. TOMAR, S.L.; ASMA, S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Periodontology**, v.71, n.5, p.743-51, 2000.

73. TONETTI, M.S.; PINI-PRATO, G.; CORTELLINI, P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, n.3, p.229-34,1995.

74. TROMBELLI, L.; CHO, K.S.; KIM, C.K.; SCAPOLI, C.; SCABBIA, A. Impaired healing response of periodontal furcation defects following flap debridement surgery in smokers. A controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, n.1, p.81-7, 2003.

75. THOMSON, W.M.; BROADBENT, J.M.; WELCH, D.; BECK, J.D. POULTON, R. Cigarette smoking and periodontal disease among 32-year-olds: a prospective study of a representative birth cohort. **Journal of Clinical Periodontology**, v.34, p.828-834, 2007.

76. VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology**. 2002 Dec;37(6):375-536.

77. VAN DER VELDEN, U.; VAROUFAKI, A.; HUTTER, J.W.; XU, I.; TIMMERMAN, M.F.; VAN WINKELHOFF, A.J.; LOOS, B.G. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. A retrospective study. **Journal of Clonical Periodontology**, v. 30, p. 603-610, 2003.

78. VAN WINKELHOFF, A.J.; BOSCH-TIJHOF, C.J.; WINKEL, E.G.; VAN DER REIJDEN, W.A. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.72, n.5, p.666-71, 2001.

79. WAHL, L.M.; CORCORAN, M.L. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. **Journal of Periodontology**, v.64, n.5, p.467-473, 1993.

80. WENDELL, K.J.; STEIN, S.H. Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. **Journal of Periodontology**, v.72, n.8, p.1038-44, 2001.

81. WESTERMARCK, J.; KÄHÄRI, V.M. Regulation of matriz metalloproteinase expresión in tumor invasión. **FaseB Journal**, v.13, p. 781-792, 1999.

82. WILLIAMS, R.C. Understanding an manging periodontal disease: A n otable past, a promising future. **Journal of Periodontology**, v.79, n.8, p.1552-1559, 2008.

83. WHO (World Health Organization) Tobacco Free Intiative. TFI [on line] Url: “http://www.who.int/tobacco/en/”. 2009.

9 ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROPORÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E 9 NA PERIODONTITE CRÔNICA. COMPARAÇÃO ENTRE FUMANTES E NÃO-FUMANTES.

1- RAZÃO DO ESTUDO:

O tabagismo é considerado o principal fator de risco para doença periodontal, afetando sua incidência e severidade. Resultados recentes têm sugerido que o consumo de cigarros influencia a expressão de citocinas na lesão periodontal favorecendo a degradação de tecido ósseo e conjuntivo. Entretanto, esses estudos avaliam um tecido processado o que impede a observação das diversas áreas da lesão. Estudos histológicos em humanos são necessários na tentativa de complementar as informações já existentes.

2- TRATAMENTO A SER REALIZADO:

Neste estudo participarão pacientes com necessidade de extração por motivos periodontais. Após o procedimento cirúrgico, os tecidos removidos serão usados na análise laboratorial. No pós-operatório será prescrito um analgésico (Paracetamol 750 mg, a cada 6 horas por 48 horas) e um anti-séptico bucal (Digluconato de clorexidina 0,12% a cada 12 horas, durante 10 dias).

3- RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que haja uma melhora na condição periodontal e de contaminação bucal dos pacientes envolvidos no estudo. Em relação ao experimento, espera-se encontrar

alguma diferença entre fumantes e não-fumantes em relação aos parâmetros investigados.

4- RISCOS

Há o risco pequeno de formação de área arroxeada e inchada no local da cirurgia, e de não fechamento total das bolsas periodontais. Nestes casos o paciente será consultado sobre sua vontade de repetir ou não o procedimento.

5- DIAGNÓSTICO DE PROBLEMAS ODONTOLÓGICOS NÃO PERIODONTAIS

Nos casos em que problemas odontológicos não periodontais forem diagnosticados, os pacientes serão avisados e aconselhados a procurar tratamento. Caso a faculdade não tenha condições de realizar o tratamento o paciente será aconselhado a procurar tratamento em outro local.

O paciente tem a liberdade de se recusar a participar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Consciente dos procedimentos, seus riscos e benefícios, autorizo o tratamento.

Pelotas,.....de.....de 200.....

....

Paciente ou responsável Pesquisador

ANEXO 2

PARECER DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo